Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, **P. Ehrlich**-Frankfurt a. M., **F. Hofmeister**-Straßburg i. Els., **C. von Noorden**-Frankfurt a. M., **E. Salkowski**-Berlin, **F. Tangl**-Budapest, **A. von Wassermann**-Berlin, **N. Zuntz**-Berlin

unter Mitwirkung von

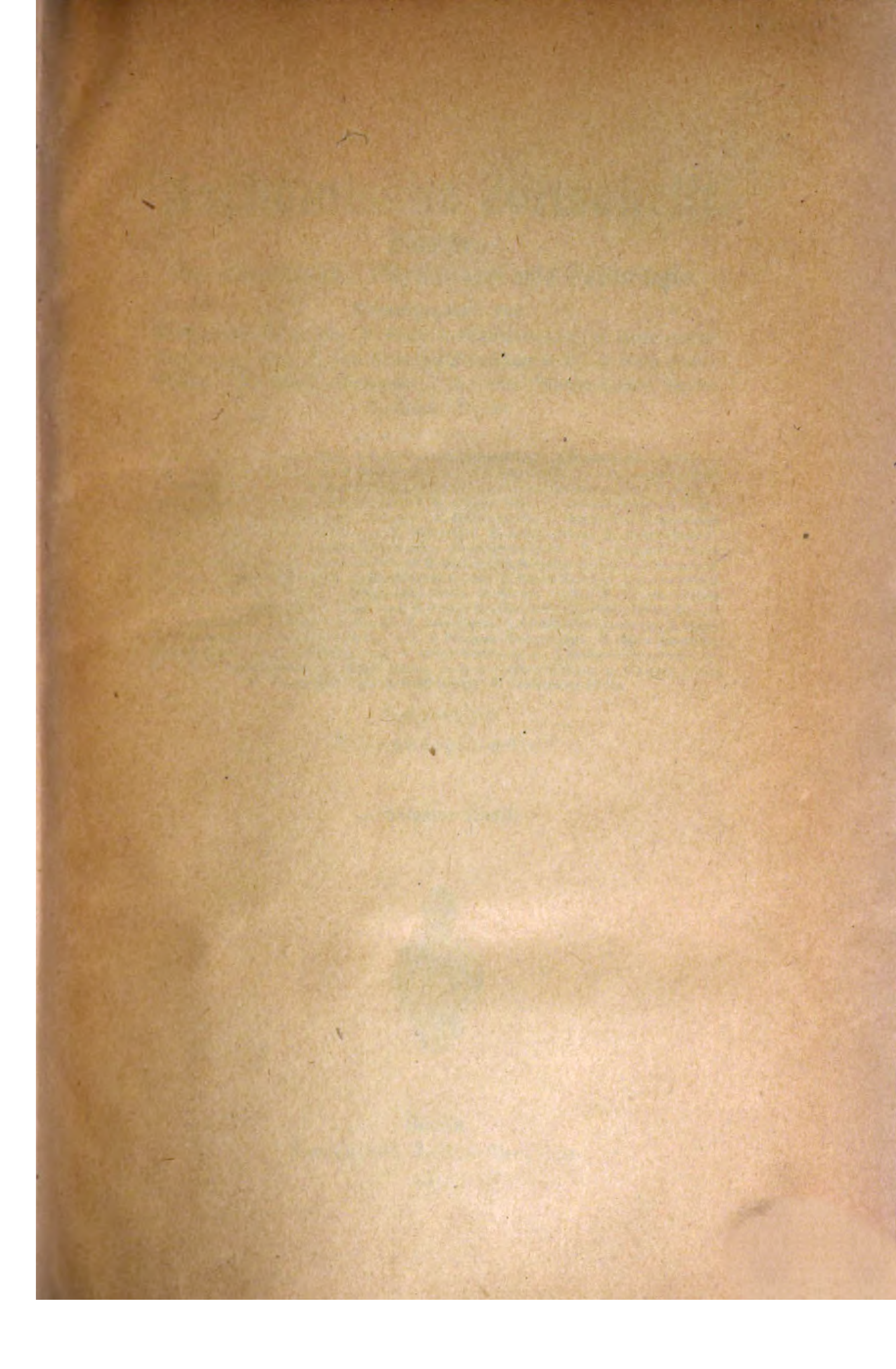
Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Siebzigster Band.



Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1915.





Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Frankfurt a. M., E. Salkowski-Berlin, F. Tangl-Budapest, A. von Wassermann-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Siebzigster Band.



Berlin.

Verlag von Julius Springer.

1915.

Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

Adler, Ludwig. Über die Phosphatasen im Malz 1

von Moraczewski, W. Über den Indolgehalt der Verdauungsprodukte von Fibrin und Casein 37

Winterstein, Hans. Neue Untersuchungen über die physikalisch-chemische Regulierung der Atmung 45

Polimanti, Osw. Untersuchungen über den Koeffizienten des osmotischen Druckes von Bombyx mori L. während des ganzen Zeitraumes seiner Entwicklung 74

Joachimoglu, Georg. Über den Nachweis des Benzols in Organen und seine Verteilung im Organismus 93

Fischer, Albert. Hemmung der Indolbildung bei Bact. coli in Kulturen mit Zuckerzusatz 105

Glagolew, P. 2,5-Diketopiperazine und Formoltitrierung 119

Siegfried, M. und **R. Zimmermann.** Über die Methode zur getrennten Bestimmung von Phenol und Parakresol im Harn 124

Winterstein, Hans. Beiträge zur Kenntnis der Narkose. III. Narkose und Erstickung 130

Joachimoglu, Georg. Vergleichende Untersuchungen über die Giftigkeit der arsenigen Säure und Arsensäure 144

Biberfeld, Johannes. Über die Mengenverhältnisse der Hirnlipoide morphingewöhnter Hunde 158

Hägglund, Erik. Über den Einfluß des elektrischen Wechselstromes auf die Gärung der lebenden Hefe 164

Richardson, Henry B. Der Einfluß von Eiweiß und Eiweißabbauprodukten auf die Glykogenbildung in der überlebenden Schildkrötenleber, ein weiterer Beitrag zur Frage der Funktion der Leber bei Verarbeitung von Eiweiß und Eiweißabbauprodukten 171

Hirsch, Ernst. Neue Ergebnisse über das Verhalten des Blutzuckers nach Aderlässen 191

Bokorny, Th. Beitrag zur Kenntnis der chemischen Natur einiger Enzyme 213

Margosches, B. M. Betrachtungen über das Verhalten von C-, H-, O-haltigen organischen Verbindungen gegen Fehlingsche Lösung 252

Herzfeld, E. Über die proteolytische Wirkung der Eiweißabbauprodukte. Proteolyse mit Trypsindialysaten, Wirkung von gallensauren Alkalien, Bedingungen der Eiweißlöslichkeit 262

Duchàček, F. Über den Yoghurtbacillus 269

Seite

Schneyer, J. Eine Methode zur quantitativen Milchsäurebestimmung im Harne 294

Stutzer, A. Untersuchungen über die Wirkung gewisser Arten von Milchsäurebakterien auf Eiweiß und auf andere Stickstoffverbindungen 299

Masslow, M. Untersuchungen über die Diazoreaktion des Hundeharnes und ihre Beziehungen zu Stoffwechselvorgängen 306

Karczag, L. und **L. Móczár.** Über die Vergärung der Brenztraubensäure durch Bakterien. II. 317

Karczag, L. und **Else Breuer.** Über die Vergärung der Brenztraubensäure durch Bakterien. III. 320

Karczag, L. und **E. Schiff.** Über die Vergärung der Brenztraubensäure durch Bakterien. IV. 325

Palitzsch, Sven. Über die Anwendung von Borax- und Borsäurelösungen bei der colorimetrischen Messung der Wasserstoffionenkonzentration des Meerwassers 333

Andersen, A. C. Zur Kenntnis der Eiweißkörper. I. 344

Oryng, Thaddäus und **Wolfgang Pauli.** Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. XIX. 368

Hirschfeld, L. und **R. Klinger.** Zur Frage der Cobragiftinaktivierung des Serums 398

Hägglund, Erik. Zur Kenntnis der Kohlenhydrate des Fichtenholzes 416

Fernau, A. und **W. Pauli.** Über die Einwirkung der durchdringenden Radiumstrahlung auf anorganische und Biokolloide 426

Andersen, A. C. und **Regitze Roed-Müller.** Zur Kenntnis der Eiweißkörper. II. 442

Schulz, Hugo. Über den Kieselsäuregehalt der menschlichen Bauchspeicheldrüse mit Bemerkungen über die Gewichtsverhältnisse der Drüse in den verschiedenen Lebensaltern 464

Pauli, Wolfgang. Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. XX. 489

Pauli, Wo. Die Hydratation der Eiweißionen 504

Autorenverzeichnis 505

Über die Phosphatasen im Malz.

Von

Ludwig Adler.

(Aus dem Laboratorium zur Förderung des Braugewerbes an der Kgl. Akademie in Weihenstephan.)

(Eingegangen am 5. März 1915.)

Mit 5 Figuren im Text.

Schon vor einigen Jahren hat Verfasser in seiner Arbeit [1]) „Über organisch und anorganisch gebundene Phosphorsäure im Bier und ihre Beziehung zu Gerste und Malz“ gezeigt, daß beim Extrahieren von Malz mit Wasser, je nach den Versuchsbedingungen, verschiedene Mengen anorganischer Phosphate in die Lösung übergehen und nach geeigneter Vorbehandlung des Materials mit enzymtötenden Mitteln die löslichen Phosphate auf einen niedrigsten Wert herabgedrückt werden können. Es ergab sich damit die Tatsache, daß wir es hier mit Enzymen zu tun haben, die befähigt sind, aus organischen Phosphatkomplexen anorganische Phosphate abzuspalten.

Vorliegende Untersuchung bezweckte nun, einen genauen Einblick in die Tätigkeit dieser Phosphatasen zu erhalten. Deshalb studierten wir in erster Linie den Einfluß von den äußeren Faktoren, die bei Enzymreaktionen stets eine wichtige Rolle spielen. Wir hielten uns dabei an eine ähnliche Arbeitsweise, wie sie seinerzeit bei der Untersuchung [2]) „Über die polypeptidliefernden und aminosäurebildenden Enzyme im Malz“ und bei der gemeinsam mit H. Lüers ausgeführten Arbeit [3]) „Die Entstehung und Bestimmung der Säure in Malz und Gerste und ihren Extrakten“ von uns angewandt wurde.

---

[1]) L. Adler, Zeitschr. f. d. ges. Brauwes. 35, 181, 1912.

[2]) L. Adler, ebenda 38, 1915, im Druck.

[3]) H. Lüers und L. Adler, Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 29, 1915.

Methodisches. Alle Phosphorsäurebestimmungen führten wir nach der einfachen und genauen Methode nach N. v. Lorenz[1]) durch, die uns auch hier wieder vorzügliche Dienste leistete. Da nämlich bei dieser Methode ein Teil des unter genau vorgeschriebenen Bedingungen erzeugten und dann gewogenen Molybdänniederschlags nur 0,03295 Teile an Phosphorsäure (P_2O_5) enthält, so war es uns möglich, die kleinen Unterschiede an Phosphaten, wie sie naturgemäß in unseren Extrakten herrschten, noch einwandfrei zu bestimmen. Über die Genauigkeit des Verfahrens siehe auch W. Plücker[2]).

Die Gesamtphosphate einer Lösung ermittelte man durch Eindampfen einer pipettierten Menge, meist von 50 ccm, in einer Platinschale auf dem Wasserbad unter Zusatz von etwa 0,2 g Magnesiumoxyd. Der Rückstand wurde vorsichtig verascht, mit Ammoniumnitrat befeuchtet und so lange geglüht, bis er vollkommen weiß war. Die Asche löste man mit heißer schwefelsäurehaltiger Salpetersäure, wie sie v. Lorenz vorschreibt, auf, nachdem man sie im Verhältnis von 2 Teilen Säuregemisch : 3 Teilen Wasser verdünnt hatte. Die Aschelösung gab man in ein Becherglas, das bei 50 ccm eine Marke aufwies, und spülte die Platinschale aus, bis dies Volumen erreicht war. Durch die vorherige Verdünnung der schwefelsäurehaltigen Salpetersäure erzielte man in der Lösung die von v. Lorenz gewünschte Konzentration. Durch Fällung mittels Molybdänlösung in der Hitze bestimmte man die vorhandene Phosphorsäure.

Da es sich bei der Wirkung der Phosphatasen nicht allein um die in Lösung gehende Gesamtphosphorsäure, die zum Teil auch aus organischen Phosphatverbindungen bestehen kann, sondern hauptsächlich um die vollkommen zu anorganischen Phosphaten abgebaute Menge handelt, so mußten wir ein Mittel verwenden, das uns diese Trennung gestattet. Bei unserer früheren Arbeit (l. c.) hat sich die quantitative Abscheidung der anorganischen Phosphate mittels Magnesiamixtur gut bewährt. Der Beweis für die Brauchbarkeit dieser Methode ist auch dort erbracht. Wie wir bei der Zusammenstellung dieser Arbeit merkten, haben in letzter Zeit auch G. Embden, W. Gries-

---

[1]) N. v. Lorenz, Landwirtschaftl. Versuchsstat. 55, 183, 1901.

[2]) W. Plücker, Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 17, 446, 1909.

bach und E. Schmitz [1]) Magnesiamixtur benutzt, um mit gutem Erfolg anorganische neben organischen Phosphaten zu bestimmen.

Die Versuchsanordnung wurde diesmal gegenüber der früher von uns beschriebenen nur unwesentlich verändert. Von dem zu untersuchenden Extrakt pipettierte man eine Probe, ebenfalls meist 50 ccm, in ein Becherglas, das bei 50 ccm eine Marke trug. Man machte mit Ammoniak deutlich alkalisch und setzte bei Zimmertemperatur etwa 20 ccm Magnesiamixtur hinzu. Nach kräftigem Umrühren ließ man bis zum vollständigen Absitzen des Niederschlags, mindestens aber 6 Stunden, stehen. Darauf filtrierte man ab und verwendete ammoniakhaltiges Wasser zum Auswaschen. Der Niederschlag wurde mit der, wie oben angegeben, 2 : 3 verdünnten, schwefelsäurehaltigen Salpetersäure in der Hitze vom Filter gelöst. Dabei ließ man die Lösung in das ursprünglich verwendete Becherglas fließen. Man ersparte sich so das nur schwer durchführbare vollkommene Sammeln des Niederschlags auf dem Filter. Man spülte dann das Filter noch so lange durch, bis 50 ccm abgelaufen waren. In dieser Lösung fällte man nach Vorschrift die Phosphorsäure.

Zu allen unseren Untersuchungen verwendeten wir dasselbe helle Darrmalz. Es wurde auf einer Mühle zu einem Schrot von etwa 95% Mehlgehalt vermahlen. Die Analyse lieferte folgende Werte:

Wassergehalt = 5,20%,
Extraktgehalt nach dem Kongreßmaischverfahren
= 77,61% auf Malztrockensubstanz.
Gesamtphosphorsäure in der Asche
= 0,5953% P_2O_5 auf lufttrocknes Malz
= 0,6280% P_2O_5 auf Malztrockensubstanz.

Einfluß der Temperatur. Je 30 g unseres Malzmehls wurden in tarierten Metallbechern mit 125 ccm dest. Wasser bei verschiedener Temperatur extrahiert. Vor dem Zugeben wurde das Wasser auf die jeweilige Temperatur gebracht. Die Versuche führte man in Wasserbädern durch, die ebenfalls auf die gewünschte Temperatur genau eingestellt waren. Die Extraktionen ließ man unter ständigem mechanischen Rühren

[1]) G. Embden, W. Griesbach, E. Schmitz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 93, 1, 1914.

$2^1/_2$ Stunden vorsichgehen, wobei man die Becher zwecks Vermeidung einer allzu großen Wasserverdunstung mit durchlochten Uhrgläsern bedeckte. Nach dieser Zeit wurde sofort auf Zimmertemperatur abgekühlt und der Inhalt jedes Bechers mit Wasser auf 180 g aufgewogen. Man mischte gut durch, filtrierte durch Faltenfilter und verwendete je 25 ccm zu den Analysen. Eine Probe wurde nach dem Eindampfen verascht; damit erhielt man den Wert für die gesamtlösliche Phosphorsäure. Eine andere Probe lieferte nach dem Zusatz von Magnesiamixtur und der angegebenen Weiterbehandlung den Wert für die anorganischen Phosphate.

Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt und auf lufttrockene Substanz berechnet. Dabei ist die mit dem Wassergehalt des Malzes in den Extrakt gelangte Wassermenge unberücksichtigt geblieben, da es sich hier in erster Linie nur um Vergleichswerte handelt.

Man ersieht, daß die Werte einem Optimumspunkte zustreben, der genau bei 58° liegt. Bei der geringsten Überschreitung dieser Temperatur tritt eine äußerst schnelle Abnahme sowohl der gesamtlöslichen wie der anorganischen Phosphorsäure ein. Bei einer kleinen Unterschreitung der Temperatur der besten Wirksamkeit ist dies nicht in gleicher Weise der Fall. Erst unterhalb 43° nehmen die Zahlen für gesamtlösliche und anorganische Phosphorsäure rasch ab. Die Phosphatasen, die bei 58° ihre Tätigkeit am günstigsten entwickeln können, werden also oberhalb dieser Temperatur schnell vernichtet, während sie unterhalb dieser Grenze bis zu 43° noch kaum ihre Reaktionskraft verringern. Erst bei weiterer Erniedrigung der Temperatur vermögen sich die Phosphatasen nicht mehr recht zu entfalten und werden gegen den Gefrierpunkt zu ihre Wirksamkeit fast gänzlich einstellen. Vollkommen aber tritt dies nie ein, wie ein Versuch ergab.

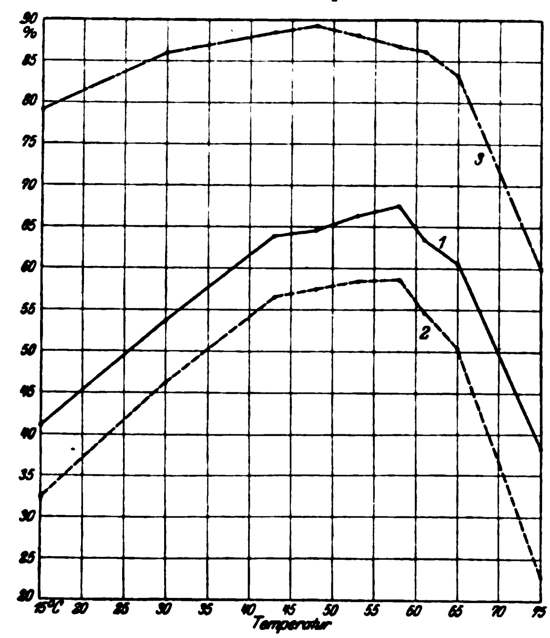
Wie wir später sehen werden, gibt es ein Mittel, die in einem Malz vorgebildeten Phosphate, die also auch ohne Enzymtätigkeit in Lösung gehen, zu bestimmen. Für unser Malz ergab sich so:
an gesamtlöslicher
Phosphorsäure = 19,65% der Gesamtphosphorsäure im Malz,
an anorganischer
Phosphorsäure = 11,42% " " " "

Tabelle I.
Einfluß der Temperatur.

Temp.	% gesamtlösliche P_2O_5 berechnet auf:		% anorganische P_2O_5 berechnet auf:		
°C	Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	gesamtlösl. P_2O_5 im Malz
15	0,2440	40,99	0,1930	32,42	79,10
30	0,3196	53,69	0,2748	46,16	85,98
43	0,3804	63,90	0,3367	56,56	88,51
48	0,3847	64,62	0,3430	57,62	89,16
53	0,3951	66,37	0,3480	58,46	88,08
58	0,4026	67,63	0,3493	58,68	86,76
61	0,3778	63,46	0,3259	54,74	86,26
65	0,3610	60,64	0,3003	50,44	83,19
75	0,2274	38,20	0,1364	22,91	59,98

Zur besseren Übersicht trugen wir obige Werte in Fig. 1 ein.

Kurventafel I.
Einfluß der Temperatur.



1 = Gesamtlösliche Phosphorsäure in Prozenten der Gesamtphosphorsäure des Malzes.
2 = Anorganische Phosphorsäure in Prozenten der Gesamtphosphorsäure des Malzes.
3 = Anorganische Phosphorsäure in Prozenten der gesamtlöslichen Phosphorsäure des Malzes.

Dagegen lieferte eine Extraktion, die wir bei + 1° mit allen Vorsichtsmaßregeln unter sonst gleichen Bedingungen wie obigen Temperaturversuch durchführten:

an gesamtlöslicher
Phosphorsäure = 32,16 % der Gesamtphosphorsäure im Malz,
an anorganischer
Phosphorsäure = 23,73 % " " " " .

Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß bei diesen tiefen Temperaturen auch die Löslichkeit der Phosphate verringert sein kann, so daß sich die Werte wohl noch um einen kleinen Betrag erhöhen würden. Deshalb wurden auch die Ergebnisse des bei 1° angestellten Versuchs nicht in die Tabelle eingetragen.

An dem Verlauf der Kurve 3 in Fig. 1 ist bemerkenswert, daß hier der Gipfelpunkt bei 48° erreicht wird. Man darf daher wohl von dem Vorhandensein von mindestens zwei Gattungen der Phosphatasen sprechen, von denen die eine unlösliche organische Phosphatkomplexe in Lösung zu bringen, die andere anorganische Phosphate zu bilden vermag. Ein Unterschied in der Löslichkeit der beiden Phosphatgruppen kann sicherlich nicht für diese Verhältnisse verantwortlich gemacht werden.

Einfluß der Zeit. Man extrahierte, um die Abhängigkeit der Enzymtätigkeit von der Versuchsdauer zu beobachten, je 30 g unseres Malzmehls verschiedene Zeiten lang mit Wasser, und zwar bei der optimalen Temperatur von 58°. Die Extraktionen gingen unter ständigem Rühren in bedeckten Bechern vor sich. Man setzte die Proben wieder mit 125 ccm vortemperiertem Wasser an und füllte nach Ablauf der Versuchszeit den Inhalt der abgekühlten Becher auf 180 g mit Wasser auf. Um eine Säuerung durch Bakterien zu verhindern, die sich besonders bei den Versuchen mit langer Dauer hätte einstellen müssen, gaben wir überall auch etwas Toluol hinzu. Da, wie wir später kennen lernen, die durch eine Säure in die Lösung gelangenden Wasserstoffionen von besonderem Einfluß auf unsere Enzyme sind, mußten wir auf diesen Umstand ein besonderes Augenmerk richten. Wir überzeugten uns bei früheren Arbeiten (l. c.) von der vorzüglichen Wirkung des Toluols betreffs der Hintanhaltung einer bakteriellen Säuerung. Leider mußten wir dabei die Wahrnehmung machen, daß dieses Mittel auch die Enzyme schwächt, allerdings nur zu einem geringen Teil. Wir

setzten deshalb bei den Versuchen mit über $2^1/_2$ stündiger Extraktionsdauer die unten angegebenen Mengen an Toluol nicht auf einmal, sondern nacheinander zu.

In je 25 ccm der filtrierten Lösung wurden die gesamt löslichen und die anorganischen Phosphate durch Veraschen bzw. durch Fällen mit Magnesiamixtur bestimmt. Die wie früher auf lufttrockene Substanz berechneten Ergebnisse sind in Tabelle II und Fig. 2 zusammengestellt.

Den enzymschwächenden Einfluß des Toluols ersieht man deutlich durch Vergleich des Versuchs bei $2^1/_2$ stündiger Dauer in Tabelle II mit dem Versuch bei 58° in Tabelle I, der ja unter gleichen Verhältnissen nur unter Weglassung des Toluols durchgeführt war. Von einer Säuerung durch Bakterien kann hier in dieser kurzen Zeit natürlich nicht die Rede sein, besonders in Anbetracht der hohen Temperatur. Die gesamtlösliche Phosphorsäure sank von 67,63 $^0/_0$ auf 64,27 $^0/_0$ der gesamten Phosphorsäure im Malz, während die anorganische Phosphorsäure von 58,68 $^0/_0$ auf 55,21 $^0/_0$ der gesamten Phosphorsäure des Malzes sich erniedrigte. Dieser störende Einfluß des Toluols mag zum kleinen Teil auch mit daran schuld sein, daß es selbst bei 24 stündiger Extraktion den Enzymen nicht gelingt, mehr als etwa 71 $^0/_0$ der gesamten Phosphorsäure des Malzes in Lösung zu bringen.

Die Kurven in Fig. 2 bieten nichts Überraschendes; sie zeigen das bei Enzymreaktionen charakteristische, anfangs rasche Ansteigen, um sich dann asymptotisch der x-Achse zu nähern. Und zwar erfolgt dies bei Kurve 1 schneller als bei Kurve 2. Während nämlich bei ersterer praktisch nach 5 Stunden schon fast der Höhepunkt erreicht ist, tritt bei letzterer dies erst nach etwa 14 Stunden ein. Dadurch offenbart sich auch hier wieder die vorher erwähnte Zweiteilung unserer Enzyme. Zum mindesten darf man wohl von einer stufenförmigen Tätigkeit sprechen, d. h. daß erst die eine Kraft der Enzyme gewirkt haben muß, bevor sich die zweite Kraft betätigen kann. In unserem Falle muß also erst eine Phosphatase lösliche Phosphate gebildet haben, worauf dann die darunter enthaltenen organischen Phosphatkomplexe von einer anderen Phosphatase in ihre Komponenten zerlegt werden. Natürlich verlaufen beide Reaktionen während der Extraktion zeitlich nebeneinander.

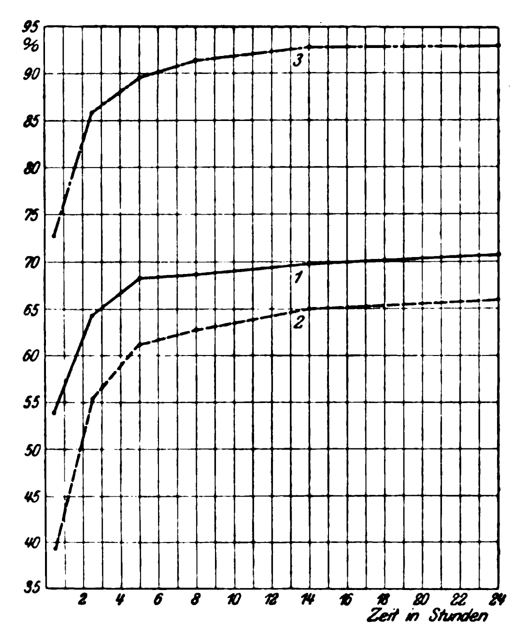
Tabelle II.

Einfluß der Zeit.

Dauer der Extraktion Stdn.	% gesamtlösl. P_2O_5 berechnet auf: Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	% anorganische P_2O_5 berechnet auf: Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	gesamtlösl. P_2O_5 im Malz	Zugesetztes Toluol ccm
1/2	0,3211	53,94	0,2338	39,27	72,81	1/2
2 1/2	0,3826	64,27	0,3287	55,21	85,91	1/2
5	0,4061	68,22	0,3635	61,06	89,51	1
8	0,4088	68,67	0,3738	62,79	91,44	1 1/2
14	0,4162	69,91	0,3868	64,98	92,94	2
24	0,4225	70,97	0,3931	66,03	93,04	3

Kurventafel II.

Einfluß der Zeit.



1 = Gesamtlösliche Phosphorsäure in Prozenten der Gesamtphosphorsäure des Malzes.

2 = Anorganische Phosphorsäure in Prozenten der Gesamtphosphorsäure des Malzes.

3 = Anorganische Phosphorsäure in Prozenten der gasamtlöslichen Phosphorsäure des Malzes.

Dabei wollen wir auch darauf hinweisen, daß es wahrscheinlich Phosphatasen gibt, die aus unlöslichen organischen Phosphatverbindungen direkt lösliche anorganische Phosphate abbauen.

Einfluß der Konzentration. Um den Einfluß zu studieren, den die Menge des zur Extraktion verwendeten Flüssigkeitsvolumens bei gleichbleibender Malzmenge auf die Wirkungsbedingungen der Phosphatasen ausübt, wurden auch in dieser Richtung Versuche angestellt. Man extrahierte $2^1/_2$ Stunden bei 58° ohne Toluolzusatz unter ständigem Rühren. Die Becher waren mit Uhrgläsern bedeckt und das zuzusetzende Wasser auf 58° vorgewärmt. Die verwendeten Malz- und Wassermengen ersieht man aus Tabelle III, worin auch die Ergebnisse zusammengestellt sind. Hier mußten die Werte auf Malztrockensubstanz umgerechnet werden unter Berücksichtigung des mit der Malzfeuchtigkeit hinzugekommenen Wasserquantums, das sich zum eingewogenen Wassergewicht addiert. Zur Analyse benutzten wir ausgewogene Pipetten, und zwar je nach der Verdünnung 10, 25, 50 und 100 ccm des Filtrates.

Aus diesen Werten ergibt sich ein äußerst großer Einfluß der Konzentration auf die Tätigkeit der Enzyme und damit die Tatsache, daß die Phosphatasen löslich und auch außerhalb der Zelle wirksam sind. Davon wird übrigens noch später die Rede sein.

Die Enzyme im Malz, die befähigt sind, aus unlöslichen organischen Phosphatverbindungen lösliche Phosphate zu liefern, zeigen eine besonders starke Abhängigkeit von der Verdünnung der Enzymlösung im Verhältnis zum Medium, auf das sie zu wirken vermögen. Von einem etwas geringeren Einfluß dieses Verhältnisses kann bei der Bildung von anorganischen Phosphaten gesprochen werden; denn während die Zunahme der gesamtlöslichen Phosphorsäure selbst bis zu einer Konzentration von 1 : 40 noch nicht ganz zum Stillstand gekommen ist, weist die anorganische Phosphorsäure bei einer Verdünnung größer als 1 : 20 eine deutliche Abnahme auf. Bis zu diesem Punkt zeigt sich aber auch hier ein stetiges Ansteigen der Kurve. Dadurch offenbart sich, daß bei zu weit getriebener Verdünnung die Enzymlösung (1 : 40), was die Entstehung der anorganischen Phosphate betrifft, nicht mehr imstande ist, ihre volle Tätigkeit zu entfalten. Der Einwand, daß bei den verdünnteren

Tabelle III.

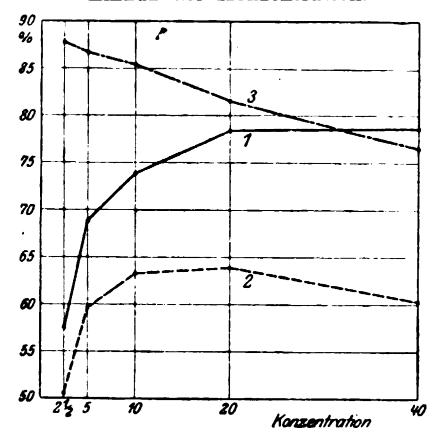
Einfluß der Konzentration.

Angewandte Menge		Konzentration	% gesamtlösliche P_2O_5 berechnet auf:		% anorganische P_2O_5 berechnet auf:		
Malz g	Wasser ccm		Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	gesamtlösl. P_2O_5 im Malz
40	100	1 : 2½	0,3614	57,55	0,3175	50,56	87,85
30	150	1 : 5	0,4321	68,81	0,3748	59,68	86,74
20	200	1 : 10	0,4640	73,88	0,3961	63,07	85,36
15	300	1 : 20	0,4924	78,41	0,4017	63,96	81,58
10	400	1 : 40	0,4938	78,63	0,3780	60,19	76,55

Die Resultate sind graphisch in Fig. 3 eingetragen.

Kurventafel III.

Einfluß der Konzentration.



1 = Gesamtlösliche Phosphorsäure in Prozenten der Gesamtphosphorsäure des Malzes.
2 = Anorganische Phosphorsäure in Prozenten der Gesamtphosphorsäure des Malzes.
3 = Anorganische Phosphorsäure in Prozenten der gesamtlöslichen Phosphorsäure des Malzes.

Extrakten auch die Lösungsbedingungen für die vorgebildeten Phosphate günstiger seien, kann vielleicht bei den organischen Phosphaten eine Spur von Berechtigung für sich beanspruchen, aber niemals bei den anorganischen Phosphaten; denn in Anbetracht der kleinen Menge dieser Salze spielt die Wassermenge gar keine Rolle. Der Unterschied in der Bildung von gesamtlöslicher (löslicher organischer) und von anorganischer Phosphor-

säure, in Abhängigkeit von der Konzentration, wird besonders klar durch das ständige Fallen von Kurve 3 vor Augen geführt.

Wir sehen also, daß, unter gewissen Einschränkungen, keineswegs durch eine stärkere Konzentration der aufeinander einwirkenden Agenzien — für unseren Fall von Enzym auf die Phosphatkomplexe —, sondern im Gegenteil durch eine größere Verdünnung die Reaktion begünstigt wird. Für diese scheinbar erstaunliche Tatsache darf aber nicht eine durch die Konzentrationsveränderung unter Umständen mitbedingte Änderung der Wasserstoffionenkonzentration in der Lösung verantwortlich gemacht werden. Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration, deren Ausführung wir später angeben werden, lieferte nämlich für obige Versuche Werte, die nur zwischen $p_{H^{\cdot}} = 6{,}0$ bis 6,2 schwankten und somit keinen maßgebenden Einfluß auf die Enzymtätigkeit ausüben können. Dadurch ergibt sich aber andererseits die interessante Tatsache, daß die Zusammensetzung der in Lösung gegangenen anorganischen Phosphate trotz der recht beträchtlichen Unterschiede in der Menge ziemlich konstant bleibt. Nach den Arbeiten von S. P. L. Sörensen[1]) entspricht einem $p_{H^{\cdot}} = 6{,}10$ ($[H^{\cdot}] = 0{,}8 \cdot 10^{-6}$) ein Verhältnis von primärem zu sekundärem Phosphat wie 4 : 1. Dies muß demnach in allen unseren Extrakten vorliegen.

Der wahre Grund für den großen Einfluß der Konzentration offenbarte sich aus den folgenden Versuchen.

Einfluß der Viscosität. Wir ermittelten die Viscosität der Lösungen mit dem Apparat von Ostwald und verglichen die Durchflußzeiten, in Sekunden gemessen, ohne Berücksichtigung der spezifischen Gewichte der Extrakte. Diese Bestimmungen wurden bei 18° durchgeführt, obwohl die Enzymversuche bei 58° verliefen. Bei den hier in Betracht kommenden Substanzen darf man wohl Proportionalität in der Viscosität bei diesen beiden Temperaturen erwarten.

Destilliertes Wasser zeigte in unserem Apparat eine Durchlaufszeit von 38,8 Sekunden. Dagegen ergaben sich für die Konzentrationsversuche 1 : 10 bzw. 1 : $2^1/_2$ Werte von 53,8 Sek. bzw. 97,8 Sek. Eine kleinere Wassermenge bei gleichbleibendem

[1]) S. P. L. Sörensen, „Enzymstudien II", diese Zeitschr. 21, 131, 1909; 22, 355, 1909; sowie Asher und Spiro, Ergebnisse der Physiologie 12, 480.

Malzgewicht hat also wohl einerseits den Vorteil, daß gleichzeitig mehr reaktionsfähige Stoffe (Enzyme) mit ihren Medien (Phosphaten) in Berührung kommen, aber andererseits auch den Nachteil, daß die Viscosität wächst, die einer innigen Berührung der Teilchen hinderlich ist.

Es wurden nun Extraktionen angesetzt, in denen wir durch Zusatz von Saccharose die Viscosität künstlich erhöhten. Daß der Zucker die Fällbarkeit der anorganischen Phosphate nicht hindert, noch bei der $2^1/_2$ stündigen Erwärmung auf 58° Veresterungen mit den Phosphaten eingeht, zeigte uns ein Vorversuch. Von den Phosphaten nach Sörensen (l. c.), die von C. A. F. Kahlbaum zu beziehen sind, mischten wir 1,3617 g primäres Kaliumphosphat (KH_2PO_4) mit 1,7814 g sekundärem Natriumphosphat ($Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$) und lösten dies Salzgemisch zum Liter. Infolge der großen „Puffer"wirkung der Phosphate würde bei einem Zugeben dieser Lösung, die ihrer Zusammensetzung gemäß ein $p_{H^\cdot} = 6{,}7$ aufweist, zu unserem Extrakt, dessen Wasserstoffionenkenzentration $p_{H^\cdot} = 6{,}1$ beträgt, eine deutliche Verschiebung nach der alkalischen Seite eintreten und schon dadurch die Enzymreaktion beeinflußt werden. Außerdem wollten wir auch die Einwirkung des Zuckers auf die Phosphatlösung bei der gleichen Wasserstoffionenkonzentration vor sich gehen lassen, wie sie in unseren Extrakten herrscht. Deshalb versetzten wir die Lösung des Phosphatgemisches so lange mit Salzsäure, bis wir die gewünschte Konzentration an Wasserstoffionen erzielten. Wir erreichten so ein $p_{H^\cdot} = 6{,}17$.

In 25 ccm dieser Lösung fällten wir nach der Verdünnung auf 50 ccm die Phosphate mittels Magnesiamixtur aus und bestimmten ihre Menge nach v. Lorenz wie üblich. Er ergaben sich 35,36 mg P_2O_5 in 25 ccm der Lösung.

Eine andere Probe von 25 ccm unserer Lösung versetzten wir mit 7 g Zucker, verdünnten auf 50 ccm und erwärmten 3 Stunden auf 58°. Dann wurde Magnesiamixtur zugegeben und ebenfalls die Phosphorsäure ermittelt. Es ergaben sich 35,37 mg P_2O_5 in 25 ccm der Lösung.

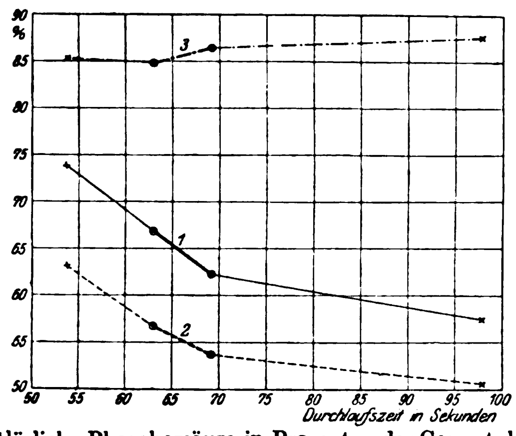
Nachdem sich so die Brauchbarkeit der Saccharose für unsere Zweeke erwiesen hatte, führten wir folgende Versuche durch. Zu je 30 g Malzmehl wurden 30 g bzw. 45 g Zucker zugewogen. Man extrahierte $2^1/_2$ Stunden bei 58° unter Rühren

mit 270 ccm Wasser. Dann wurde auf 360 g bzw. 375 g mit Wasser aufgefüllt. Sowohl in dem 10 % wie in dem 15 % Zucker enthaltenden Extrakt führte man die Phosphatbestimmungen aus und ermittelte auch die Viscosität. Diese Ergebnisse sowie die Werte eines gleichen zuckerfreien Extraktes sind in Tabelle IV zusammengestellt. Sie sind, wie alle folgenden Resultate, auf Trockensubstanz berechnet.

Tabelle IV.
Einfluß der Viscosität.

Zugesetzter Zucker	Durchflußzeit	% gesamtlösliche P_2O_5 berechnet auf:		% anorganische P_2O_5 berechnet auf:		
g	Sek.	Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	gesamtlösl. P_2O_5 im Malz
—	53,8	0,4640	73,88	0,3961	63,07	85,36
30	63,0	0,4205	66,96	0,3569	56,83	84,87
45	69,2	0,3903	62,15	0,3375	53,74	86,47

Kurventafel IV.
Einfluß der Viskosität.



1 = Gesamtlösliche Phosphorsäure in Prozenten der Gesamtphosphorsäure des Malzes.
2 = Anorganische Phosphorsäure in Prozenten der Gesamtphosphorsäure des Malzes.
3 = Anorganische Phosphorsäure in Prozenten der gesamtlöslichen Phosphorsäure des Salzes.

In Fig. 4 sind die Zahlen aus Tabelle IV sowie die früher gewonnenen Werte für die Konzentration 1 : 2½ graphisch eingetragen. Dabei sind die aus den zuckerhaltigen Extrakten

gewonnenen Ergebnisse mit Kreischen verzeichnet und unter sich mit starken Strichen verbunden, während die Resultate der zuckerfreien Lösungen durch Kreuze gekennzeichnet sind und die Verbindung mit den Werten aus den Zuckerextrakten mit dünnen Linien hergestellt ist. Aus den Kurven läßt sich erkennen, daß die durch die Konzentrationsveränderung erhaltenen Zahlen in der natürlichen Verlängerung der Kurve liegen, die von den Saccharose enthaltenden Extrakten geliefert wird. Die starke Abhängigkeit der Phosphatasen von der Konzentration muß somit hauptsächlich auf die dadurch bedingte Viscositätsänderung zurückgeführt werden. Je größer die innere Reibung eines Extraktes, um so weniger können unsere Enzyme ihre Tätigkeit entwickeln.

Einfluß der entstandenen Reaktionsprodukte. Auf Enzyme wirken oft die gebildeten Produkte hemmend ein. Um diese Verhältnisse für die Phosphatasen zu studieren, versetzten wir 30 g Malzmehl mit 220 ccm Wasser, gaben dazu 50 ccm obiger Phosphatlösung und extrahierten $2^1/_2$ Stunden bei 58° unter Rühren. Einen anderen Versuch führten wir mit 200 ccm Wasser und 75 ccm der Phospatlösung durch unter sonst gleichen Bedingungen. Dann wurde auf 330 g aufgefüllt, vermehrt um das mit der Phosphatlösung hinzugekommene jeweilige Salzgewicht. Vom Filtrat führte man in je 50 ccm die Analysen aus. Von den erhaltenen Werten wurde die entsprechende Menge des zugesetzten Phosphats abgezogen. Auch hier bei der Berechnung der auf 50 ccm entfallenden, angewandten Phosphorsäure wurde das aus dem Malz stammende Wasser berücksichtigt, d. h. das Gesamtvolumen an Wasser wurde nicht mit 300 ccm, sondern mit 301,56 ccm angenommen.

Tabelle V.

Einfluß der entstandenen Reaktionsprodukte.

Zugesetzte Phosphatlösung ccm	% gesamtlösliche P_2O_5 berechnet auf:		% anorganische P_2O_5 berechnet auf:		
	Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	gesamtlösliche P_2O_5 im Malz
—	0,4640	73,88	0,3961	63,07	85,36
50	0,4636	73,82	0,3747	59,66	80,82
75	0,4639	73,87	0,3656	58,22	78,81

Die in Tabelle V zusammengestellten Ergebnisse zeigen ein langsames Abnehmen der anorganischen Phosphate. Man kann also von einer Schwächung des anorganische Phosphorsäure bildenden Enzyms sprechen. Die Phosphatase, welche die löslichen Phosphate erzeugt, ist keineswegs beeinträchtigt worden; denn diese Werte bleiben unverändert. Dabei muß bemerkt werden, daß wir ja nur die Spaltprodukte der ersteren Enzymgruppe hinzusetzten und vielleicht deshalb eine Wirkung auf die zweite Gruppe bei dieser Versuchsanordnung überhaupt nicht erzielen können.

Die Annahme, daß trotz der Ergebnisse des früheren Versuchs, der die quantitative Fällbarkeit der anorganischen Phosphate aus einer Zucker enthaltenden Lösung erwies, doch hier eine Spur der zugesetzten Phosphate, sei es in chemischer Bindung an organische Körper, sei es durch Adsorption, der Abscheidung mittels Magnesiamixtur entgangen sei, kann widerlegt werden; denn wenn auch zugegeben werden muß, daß in unserem Extrakt außer Zucker und anderen Kohlenhydraten noch eine große Menge von Proteinen und sonstigen Stoffen enthalten ist, so hat andererseits Verfasser in einer früheren Arbeit (l. c.) nachgewiesen, daß wenigstens aus künstlichen Mischungen von Dextrinen, Eiweiß und Zucker zugegebenes Phosphat durch Magnesiamixtur vollständig wieder ausgefällt werden kann. Wir dürfen also behaupten, daß eine übermäßige Anreicherung von anorganischen Phosphaten infolge einer enzymatischen Tätigkeit hemmend auf die weitere Bildung einwirkt. Dies wird zum Teil auch bei der Verminderung der Enzymwirkung in den konzentrierteren Extrakten eine Rolle gespielt haben.

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration. Dem zur Extraktion dienenden Wasser setzte man verschiedene Mengen etwa $^n/_2$-Salzsäure bzw. etwa $^n/_2$-Natronlauge hinzu, wobei man dafür sorgte, daß das verwendete Flüssigkeitsvolumen insgesamt 270 ccm betrug. Die Versuche führten wir stets $2^1/_2$ Stunden bei 58^0 unter Rühren durch. Angewandt wurden 30 g Malzmehl. Nach Ablauf der Extraktionszeit wurde abgekühlt und mit Wasser auf je 330 g aufgefüllt, um das Gewicht des zugesetzten Reagens aufzuheben. In den filtrierten Extrakten ermittelte man neben der Phosphorsäure auch die

Wasserstoffionenkonzentration. Diese wurde gemessen nach den Angaben von S. P. L. Sörensen (l. c.) und L. Michaelis[1]) unter Verwendung der Elektrode von Michaelis, die das Arbeiten mit ruhender Wasserstoffatmosphäre gestattet. Als Verbindungsstück benutzten wir das von H. Lüers konstruierte Heberröhrchen. Die erhaltenen Werte für die Wasserstoffionenkonzentration drücken wir nach dem Vorschlag von S. P. L. Sörensen durch den Exponenten ($p_{H^{\cdot}}$) aus.

Die Ergebnisse sind in Tabelle VI und in Fig. 5 auch graphisch zusammengetragen.

Tabelle VI.

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration.

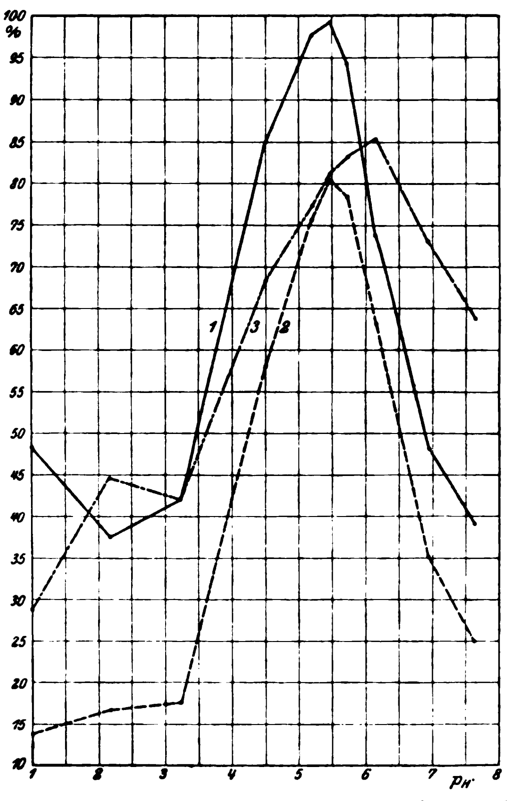
Zugesetztes Reagens	$p_{H^{\cdot}}$	% gesamtlösl. P_2O_5 berechnet auf:		% anorganische P_2O_5 berechnet auf:		
		Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	gesamtlösl. P_2O_5 im Malz
60 ccm n/2-HCl . .	1,00	0,3029	48,23	0,0869	13,84	28,69
20 ccm n/2-HCl . .	2,17	0,2355	37,50	0,1050	16,72	44,59
10 ccm n/2-HCl . .	3,23	0,2637	41,99	0,1108	17,64	42,02
5 ccm n/2-HCl . .	4,49	0,5337	84,98	0,3643	58,01	68,26
3,3 ccm n/2-HCl . .	5,17	0,6142	97,80	0,4753	75,69	77,39
2,5 ccm n/2-HCl . .	5,44	0,6229	**99,19**	0,5052	**80,45**	81,11
1,8 ccm n/2-HCl . .	5,71	0,5920	94,27	0,4930	78,50	83,28
—	6,14	0,4640	73,88	0,3961	63,07	**85,86**
2,5 ccm n/2-NaOH .	6,93	0,3023	48,14	0,2210	35,19	73,11
5 ccm n/2-NaOH .	7,62	0,2454	39,08	0,1565	24,92	63,77

Den weitaus größten Einfluß von allen bisher untersuchten Verhältnissen übt bezüglich der Wirksamkeit der Phosphatasen die Menge der in der Lösung vorhandenen Wasserstoffionen aus. Schon durch die geringe Verschiebung des in den normalen Extrakten herrschenden $p_{H^{\cdot}} = 6{,}14$ ($[H^{\cdot}] = 0{,}72 \cdot 10^{-6}$) auf $p_{H^{\cdot}} = 5{,}44$ ($[H^{\cdot}] = 0{,}36 \cdot 10^{-5}$) ist es uns gelungen, fast die ganze Phosphorsäure des Malzes in Lösung zu bringen. Was selbst eine 24stündige Extraktion nicht erreichte, erzielte die optimale Wasserstoffionenkonzentration in dem 10. Teil von Zeitaufwand. Auch die anorganischen Phosphate weisen in diesem Punkt einen Höchstwert auf, der allerdings noch ziemlich weit von 100% entfernt bleibt. Da diesen Versuchen

[1]) L. Michaelis, „Die Wasserstoffionenkonzentration". Verlag Julius Springer, Berlin 1914.

Kurventafel V.

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration.



1 = Gesamtlösliche Phosphorsäure in Prozenten der Gesamtphosphorsäure des Malzes.
2 = Anorganische Phosphorsäure in Prozenten der Gesamtphosphorsäure des Malzes.
3 = Anorganische Phosphorsäure in Prozenten der gesamtlöslichen Phosphorsäure des Malzes.

aber nur eine $2^1/_2$ stündige Extraktionszeit zur Verfügung stand und wir aus den früheren Ergebnissen über den Einfluß der Zeit ersehen konnten, daß besonders die die anorganischen Phosphate bildenden Enzyme zu einer intensiven Tätigkeit eine längere Einwirkungsdauer beanspruchen, so ließen wir eine Extraktion mit 2,5 ccm $^n/_2$-HCl 18 Stunden unter den sonst gleichen Bedingungen wie oben verlaufen. Die Ergebnisse sind folgende: $p_{H^\cdot} = 5,36$;

gesamtlösliche Phosphorsäure = 0,6291 % des Malzes
= **100,18 %** der Gesamtphosphorsäure im Malz;
anorganische Phosphorsäure = 0,5863 % des Malzes
= **93,86 %** der Gesamtphosphorsäure im Malz
= 93,20 % der gesamtlöslichen Phosphorsäure im Malz.

Die ganze Phosphorsäure des Malzes ist nun in Lösung gegangen, und davon ist fast alles zu anorganischen Phosphaten abgebaut.

Das Optimum der Wasserstoffionenkonzentration für die Phosphatasen ist eng begrenzt und bei $p_{H^{\cdot}} = 5{,}4$ gelegen. Durch eine geringfügige Änderung nach der einen oder anderen Seite wird die Tätigkeit der Enzyme wesentlich beeinflußt. Die in den gewöhnlichen Extraktionen herrschende Wasserstoffionenkonzentration muß als ungünstig bezeichnet werden für die Enzymwirkung, vor allem was die Bildung der gesamtlöslichen Phosphate betrifft. Die Enzymkräfte, die an der Entstehung der anorganischen Phosphate beteiligt sind, sind weniger empfindlich gegen Hydroxylionen, wie Kurve 3 erkennen läßt, die bei $p_{H^{\cdot}} = 6{,}14$ den Gipfelpunkt zeigt. Eine weitere Verringerung der Wasserstoffionen und damit verbundene Anreicherung der Hydroxylionen führt schnell zur fast vollkommenen Vernichtung der Enzyme. Schon in der Nähe des wahren Neutralpunktes ($p_{H^{\cdot}} = 7{,}07$) ist die Enzymtätigkeit auf ein Minimum herabgedrückt.

Erwähnenswert ist noch, daß bei wachsender Hydroxylionenkonzentration auch die Löslichkeitsverhältnisse verändert werden; denn die im Extrakt vorhandenen Calcium- und Magnesiumsalze setzen sich mit den Phosphaten zu unlöslichen Verbindungen in dem Maße um, in dem die Reaktion alkalischer wird. Schon dadurch müssen sich die Werte der gesamtlöslichen und anorganischen Phosphorsäure verringern.

Wir haben deshalb die Phosphorsäure des Extrakts, die an die Erdalkalien (Ca, Mg) gebunden ist, durch Fällen mit Ammoniak allein bestimmt. Wir führten dies in drei der obigen Extrakte durch. Je 50 ccm versetzte man bei Zimmertemperatur mit einem deutlichen Überschuß von Ammoniak und ließ 12 Stunden stehen. Nach diesem Verfahren bestimmten wir auch früher (l. c.) die Erdalkaliphosphorsäure in Malz-

auszügen. Der auf dem Filter gesammelte Niederschlag wurde wie üblich weiterbehandelt. Die Analysenwerte finden sich in Tabelle VII.

Tabelle VII.

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Erdalkaliphosphorsäure.

Zugesetztes Reagens	p_H	$^0/_0$ Erdalkaliphosphorsäure berechnet auf:			
		Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	gesamt-lösl. P_2O_5 im Malz	gesamte anorgan. P_2O_5 im Malz
2,5 ccm $^n/_1$-HCl . .	5,44	0,3648	58,09	58,56	72,21
—	6,14	0,2201	35,05	47,44	55,57
2,5 ccm $^n/_1$-NaOH .	6,93	0,0804	12,80	26,60	36,38

Durch eine einfache Überlegung läßt sich zeigen, daß die Löslichkeitsverringerung der Calcium- bzw. Magnesiumphosphate bei abnehmender Wasserstoffionenkonzentration von $p_H = 6,14$ auf $p_H = 6,93$ an der Verminderung der Werte für anorganische Phosphorsäure wenigstens nicht allein schuld sein kann; denn mehr als die Differenz von $0,2201\,^0/_0 - 0,0804\,^0/_0 = 0,1397\,^0/_0$ Erdalkaliphosphorsäure des Malzes (Tabelle VII) darf keinesfalls auf eine Verschlechterung der Löslichkeit gesetzt werden. Addiert man diese Menge zu dem bezüglichen Wert für anorganische Phosphorsäure (Tabelle VI), so ergibt sich $0,2210\,^0/_0 + 0,1397\,^0/_0 = 0,3607\,^0/_0$ anorganische Phosphorsäure des Malzes, was immer noch weniger ist als der betreffende Wert der normalen Extraktion ($p_H = 6,14$). Zum mindesten muß also ein Teil der Abnahme an Phosphaten auf die enzymschwächende Wirkung der Hydroxylionen zurückgeführt werden. Inwieweit bei der Entstehung der Erdalkaliphosphorsäure Phosphatasen, die Erdalkaliphosphate zu lösen im stande sind, oder überhaupt Enzyme, die Calcium- und Magnesiumsalze aus anderen Verbindungen freimachen, eine Rolle spielen, ist eine Frage für sich. Doch spricht auch hier viel für die Annahme solcher Enzyme im Hinblick auf die Verschiedenheit der Werte in Tabelle VII, besonders was die letzte Rubrik betrifft. Die Löslichkeitsverhältnisse allein können keine solchen Unterschiede bedingen.

Gegen eine Anreicherung an Wasserstoffionen sind die Phosphatasen weit weniger empfindlich als gegen Hydroxylionen; denn bezüglich der enzymvernichtenden Kraft entspricht einem $p_{OH'} = 7{,}3$ etwa ein $p_{H^{\cdot}} = 2{,}5$, wie sich aus Fig. 5 Kurve 1 ergibt.

Das anfängliche Sinken der Werte an gesamtlöslicher Phosphorsäure mit wachsendem $p_{H^{\cdot}}$ erklärt sich leicht durch die Annahme, daß eine organische Phosphorverbindung in Lösung geht, die einerseits nur in größerer Säuremenge gelöst wird und andererseits infolge der Schwächung der Enzyme nicht mehr abgebaut werden kann. Für die Richtigkeit dieser Vermutung spricht auch die Konstanz der anorganischen Phosphorsäure im entsprechenden Teil der Kurve (Kurve 3). Wir haben es hier wohl mit dem Phytin zu tun, das von K. Geys[1]) in den Gerstenspelzen nachgewiesen wurde. Bei unseren früheren Untersuchungen (l. c.) lösten wir mit 0,4 $^{0}/_{0}$iger Salzsäure, wie sie auch in unserem Extrakt von $p_{H^{\cdot}} = 1{,}0$ vorliegt, das Phytin aus Gerste und Malz heraus. Es hat sich somit gezeigt, daß wir damals die richtige Säurekonzentration wählten, wobei natürlich stets ein Verhältnis von Malz zu Wasser wie 1 : 10 vorausgesetzt wird. Bei geringerer Säuremenge beginnen schon die Phosphatasen ihre Tätigkeit, was sich durch das stete Ansteigen von Kurve 1 und besonders von Kurve 2 bemerkbar macht. Das neben anderen organischen Phosphatkomplexen vorhandene Phytin wird nun von der Phytase, für deren Anwesenheit im Malz wir später Beweise bringen werden, in lösliche anorganische Phosphorsäure abgebaut.

Über die analytische Trennung des Phytins von der anorganischen Phosphorsäure sei einstweilen nur folgendes erwähnt: Da das Phytin mit Magnesiamixtur in ammoniakalischer Lösung ausfällt, vermengt es sich mit der anorganischen Phosphorsäure. Durch unsere Arbeitsweise, die wir besonders im Hinblick auf das Phytin so wählten, bleibt es in der starken schwefelsäurehaltigen Salpetersäure gelöst, während die anorganische Phosphorsäure mit der Molybdänlösung ausfällt. Das Phytin kann höchstens zu einem geringen Teil zersetzt werden.

---

[1]) K. Geys, „Beiträge zur chemischen Kenntnis der Gerstenspelzen“. Diss., München 1910.

Zur Vorsicht erhitzten wir auch sämtliche Lösungen, die verdächtig waren, neben der anorganischen Phosphorsäure Phytin zu enthalten, vor dem Zusatz des Molybdäns nur auf etwa 50° und ließen dafür 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Daß auf diese Weise das Phytin kaum gespalten wird, noch die veränderten Fällungsbedingungen die Genauigkeit der Lorenzmethode beeinträchtigen, darüber werden wir im letzten Abschnitt dieser Abhandlung, wo noch des öfteren vom Phytin die Rede sein wird, berichten.

Versuche zur Vernichtung der Phosphatasen.

Bei früheren Versuchen[1]) hatte sich die Anwendung des Alkohols zur Abtötung von Enzymkräften gut bewährt. Wir versuchten nun hier eine ähnliche Arbeitsweise zwecks Vernichtung der Phosphatasen. Man darf wohl annehmen, daß nur dann die Enzyme sicher vollständig zerstört sind, wenn die auch unter wechselnden Bedingungen aus demselben Malz gewonnenen Extrakte gleiche Werte an Phosphaten aufweisen. Vor allem dürfen dann die bei Enzymreaktionen so wichtigen Faktoren, Zeit und Temperatur, in den enzymbefreiten Extraktionen keine Rolle mehr spielen. Als Maß der durch die wechselnde Alkoholvorbehandlung erreichten Enzymtötung diente uns deshalb der Unterschied an Phosphaten einerseits bei einer lang bzw. kurz, andererseits bei einer warm bzw. kalt durchgeführten Extraktion.

Wir ließen auf je 30 g unseres stets verwendeten Malzmehls Alkohol von verschiedener Konzentration unter verschiedenen Bedingungen einwirken. Von einer Alkoholvorbehandlung nur in der Kälte wurde von vornherein abgesehen, da wir die Zwecklosigkeit dieses Verfahrens, das allerdings manchmal empfohlen wird, schon früher kennen lernten. Die Versuche führten wir meist in Metallbechern aus, die mit durchlochten Uhrgläsern bedeckt waren. Dabei wurde so lange mechanisch gerührt, bis die Masse durch die Verdunstung des Alhohols zu dickbreiig wurde. Dann knetete man noch meist mittels der Hand mehrere Male durch und zerdrückte die gebildeten Klümpchen. Der benutzte Alkohol wurde vorm Gebrauch gegenüber Phenolphthalein neutralisiert.

[1]) L. Adler, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen 37, 105, 1914 u. l. c

Die nach der Alkoholbehandlung folgenden wässerigen Extraktionen setzte man stets in einer Konzentration von 1 : 10 an. Auf die noch vom Malzmehl zurückgehaltenen Alkoholmengen wurde auch bei den Versuchen, bei denen wir den Alkohol absichtlich nicht ganz entfernten, keine Rücksicht beim Auffüllen mit Wasser genommen; denn der Fehler, der durch das kleinere spezifische Gewicht des Alkohols entsteht, hebt sich durch die stattfindende Contraction von Alkohol mit Wasser fast wieder auf. Von den zur Staubtrockne erhitzten Proben wurde im Durchschnitt sowieso nur etwa 1 g an Feuchtigkeit zurückgehalten, die wohl zum größten Teil aus Wasser bestand. Allen bei 45° durchgeführten Extraktionen wurden 10 Tropfen Toluol zugesetzt. Die auf Trockensubstanz berechneten Werte sind in Tabelle VIII vereinigt.

Wie man aus den zahlreichen Analysen ersehen kann, ist es nicht so einfach, durch eine Alkoholvorbehandlung die Tätigkeit der Phosphatasen vollkommen auszuschalten. Eine kurze Einwirkung des 96%igen Alkohols bei 82 bis 95° vermag die Enzyme nur zu schwächen, nicht zu vernichten. Der niedrige Wert von Versuch 1 ist nur durch die kurze Extraktionsdauer bedingt. Bei Verlängerung derselben und bei Erhöhung der Temperatur machen sich die Enzyme wieder deutlich bemerkbar (Versuch 2 bis 4). Ähnlich liegen die Verhältnisse bei längerer Einwirkungszeit des Alkohols bei etwa 80° (Versuch 5 und 6). Bei dieser Versuchsanordnung wollten wir beobachten, ob ein Erhitzen des Malzmehls über 80° insofern schädlich wirkt, als dadurch unter Umständen unlösliche organische Phosphatkomplexe in lösliche Phosphorsäure gespalten werden könnten. Dies scheint aber nach den Ergebnissen keineswegs der Fall zu sein. Selbst durch ein 1stündiges (Versuch 7 und 8) und sogar durch ein 6stündiges (Versuch 9 und 10) Kochen des Materials mit 96%igem Alkohol erreichten wir noch nicht das gewünschte Ziel, wenn wir auch deutlich hier schon eine Zunahme in der Wirkung der Enzymvernichtung beobachten können. Die von F. Schönfeld und S. Sokolowski[1]) auf Grund meiner früheren Arbeit (l. c.) vorgeschlagene

[1]) F. Schönfeld und S. Sokolowski, Wochenschr. f. Brauerei **31**, 493, 1914.

Tabelle VIII. Extraktionen nach wechselnder Alkoholbehandlung.

Einwirkung des Alkohols	Wässerige Extraktion			Ergebnisse					Versuch Nr.
	Temp.	Dauer	Art	% gesamtlösl. P_2O_5 berechn. auf:		% anorganische P_2O_5 berechnet auf:			
	°C	Std.		Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	gesamt-lösl. P_2O_5 im Malz	
30 ccm 96%iger Alkohol verwendet. Die Becher stets unbedeckt. Zum lebhaften Sieden erhitzt. Anfangstemperatur etwa 82°. Dann langsam gesteigert bis auf 95°. Die ganze Versuchsdauer 20 Min. Der Rückstand schwer knetbar und stark alkoholhaltig.	18	2	mech. gerührt	0,1307	20,81	0,0746	11,88	57,08	1
	18	8	do.	0,1521	24,22	0,0885	14,09	58,19	2
	45	2	do.	0,1959	31,19	0,1025	16,32	52,32	3
	45	5	do.	0,2363	37,63	0,1213	19,32	51,33	4
Mit 60 ccm 96%igem Alkohol angesetzt. Bedeckte Becher. Während des ganzen Versuchs etwa 80°. Nach 1 Std. weitere 50 ccm Alkohol, nach 2 Std. nochmals 20 ccm Alkohol zugegeben. Dann Uhrglas entfernt und nach 3/4 Std. Rückstand staubtrocken.	18	8	mech. gerührt	0,1411	22,47	0,0765	12,18	54,22	5
	45	5	do.	0,2134	33,98	0,0988	15,73	46,30	6
Mit 90 ccm 96%igem Alkohol im bedeckten Becher 1/2 Std. auf 85° erhitzt. Dann offen auf 95°. Gesamtdauer 1 Std. Rückstand staubtrocken.	18	5	mech. gerührt	0,1367	21,77	0,0790	12,58	57,79	7
	45	5	do.	0,2179	34,70	0,0955	15,21	43,83	8
Mit 90 ccm 96%igem Alkohol im bedeckten Becher auf 85° erhitzt. Der verdampfte Alkohol von Zeit zu Zeit ergänzt. Nach 5 1/2 Std. offen auf 95°. Gesamtdauer 6 Std. Rückstand staubtrocken.	18	5	mech. gerührt	0,1315	20,94	0,0720	11,47	54,75	9
	45	5	do.	0,2011	32,02	0,0904	14,40	44,95	10
Am Rückflußkühler im Kolben mit 112 ccm 96%igem Alkohol 3 Std. im Wasserbad zum lebhaften Sieden erhitzt. Dann Alkohol verdampft und den Rückstand auf 98° erwärmt bis zur Staubtrockne.	18	18	öfters kräftig geschüttelt	0,1855	29,54	0,0829	13,20	44,69	11
	45	3	do.	0,1755	27,95	0,0848	13,51	48,32	12
Mit 90 ccm 90%igem Alkohol im bedeckten Becher auf 88° erhitzt. Der verdampfte Alkohol von Zeit zu Zeit ergänzt (mit 90%). Nach 2 1/2 Std. offen auf 98°. Gesamtdauer 3 Std. Rückstand staubtrocken.	18	5	mech. gerührt	0,1206	19,20	0,0785	12,50	65,09	13
	18	18	do.	0,1221	19,45	0,0771	12,28	63,14	14
	45	5	do.	0,1524	24,27	0,0867	13,81	56,89	15
Mit 100 ccm etwa 85%igem Alkohol (90 ccm 96%igem Alkohol + 10 ccm Wasser) im bedeckten Becher auf 90° 20 Min. lang erhitzt. Dann offen die Temperatur schnell gesteigert. 40 Min. bei 98°. Der trockene Rückstand etwas knollig.	18	2	öfters von Hand gerührt	0,1234	19,65	0,0717	11,42	58,10	16
	18	2	mech. gerührt	0,1228	19,55	0,0725	11,55	59,06	17
	18	5	do.	0,1246	19,84	0,0718	11,44	57,65	18
	18	15	öfters von Hand gerührt	0,1231	19,60	0,0727	11,58	59,09	19
	45	5	mech. gerührt	0,1562	24,87	0,0848	13,51	54,31	20

Methode wurde in Versuch 11 durchgeführt. Auch hier kann von einer vollständigen Ausschaltung der Enzymtätigkeit nicht die Rede sein. Die Warmextraktion (Versuch 12) ergab schon einen ganz befriedigenden Wert, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß nur eine 3stündige Extraktionsdauer angewandt wurde. Dem Kochen am Rückflußkühler haften überhaupt die Unannehmlichkeiten an, daß einerseits beim Erhitzen die untersten Teile des Malzes im Kolben mit dem Alkohol nicht innig genug in Berührung kommen, da sie stets etwas zusammenbacken, und andererseits, daß die letzten Reste des Alkohols sich nur unter großem Zeitverlust verdampfen lassen. Die Temperatur dabei über 100° zu nehmen, widerraten F. Schönfeld und S. Sokolowski, um Spaltungen zu vermeiden.

Erst die Versuche mit schwächerem Alkohol (Versuche 13 bis 20), der es gestattet, die Erhitzungstemperatur höher zu nehmen, lieferten ein günstiges Ergebnis. Doch auch hier sind scheinbar die Enzyme nicht vollständig vernichtet, da durch Steigerung der Extraktionstemperatur eine Zunahme an Phosphaten eintritt. Es sind dies etwa 5% der gesamtlöslichen, aber nur etwa 2% der anorganischen Phosphate, die sich bei 45° mehr herauslösen als bei Zimmertemperatur. Wären wirklich noch nennenswerte Mengen an Enzym lebenskräftig, so müßte das Verhältnis eher umgekehrt sein. Wir müssen also annehmen, daß bei höherer Temperatur schwer lösliche organische Phosphatverbindungen in Lösung gehen. Dies bestätigt uns die Betrachtung der vorletzten Rubrik in Tabelle VIII; denn hier zeigt fast durchweg die anorganische Phosphorsäure in Prozenten der gesamtlöslichen Phosphorsäure in den Extrakten bei 45° einen niedrigeren Wert als in den entsprechenden Extrakten von 18°.

Die kleine Zunahme der anorganischen Phosphate bei der Warmextraktion läßt sich schwer erklären. Keinesfalls darf der durch die höhere Temperatur verbesserten Lösungsbedingung die Schuld zugeschrieben werden; denn es müßte dann auch die 15stündige Extraktion mehr in Lösung bringen als die 2stündige, was aber nicht der Fall ist. Eine weitere Vermutung wäre die, daß beim Kochen des Malzmehls mit Alkohol ein Teil der Phosphate vom koagulierten Eiweiß adsorbiert

würde. Dies ist bei Salzen eine bekannte Tatsache. Bei der Extraktion in der Kälte würde diese Menge dann fehlen, während in der Wärme durch die eingetretene Quellung der Proteine sie wieder gelöst werden könnte. Gegen diese Annahme spricht einerseits die Tatsache, daß die Werte nach 6 stündiger Alkoholkochung, wodurch doch sicher eine vollkommene Koagulation der in Betracht kommenden Eiweißstoffe eintritt, höher ausfielen als die letzten Versuche mit 90 %igem bzw. 85 %igem Alkohol, und andererseits das Ergebnis folgenden Versuchs. Von einem Malzauszug, den man durch 7 stündige Digestion mit 5 Teilen Wasser hergestellt hatte, wurde eine Probe wie üblich analysiert. Eine andere Probe erhitzte man 1/2 Stunde, um das koagulierbare Eiweiß abzuscheiden, füllte dann auf das ursprüngliche Gewicht mit Wasser wieder auf und untersuchte das Filtrat. Es ergab sich für 100 ccm Extrakt:

Ungekochte Probe:

Gesamte Phosphorsäure = 51,36 mg.
Anorganische " = 39,60 mg = 77,10 % der gesamten Phosphorsäure.

Gekochte Probe:

Gesamte Phosphorsäure = 51,66 mg.
Anorganische " = 40,04 mg = 77,51 % der gesamten Phosphorsäure.

Die kleine Zunahme an Phosphaten kann neben Versuchsfehlern, wenigstens was die anorganischen betrifft, auf die zum Abkochen notwendige, wenn auch kurze Erwärmung auf die für die Enzyme günstigen Temperaturen zurückzuführen sein. Jedenfalls hat das koagulierte Eiweiß nichts zurückgehalten.

Aus allen diesen Gründen möchte ich die geringe Vermehrung der anorganischen Phosphate und damit vielleicht auch eines Teils der gesamtlöslichen Phosphate bei der Extraktion von 45° gegenüber der von 18° nach der gleichen Vorbehandlung mit 85 %igem Alkohol doch noch einer schwachen Enzymwirkung zuschreiben. Die Phosphatasen erweisen sich also als sehr widerstandsfähig gegen die Abkochung mit Alkohol. Wir erkannten dies auch schon bei unserer früheren Arbeit (l. c.).

Bei obigen Versuchen hat sich andererseits gezeigt, daß sich eine sehr gute Konstanz der Werte erreichen läßt, wenn

man das mit 85%igem Alkohol abgekochte Malzmehl bei Zimmertemperatur extrahiert. Der Einfluß der Extraktionsdauer ist vollständig aufgehoben. Dies spricht dafür, daß wir es hier bei diesen Kaltextraktionen mit den wirklichen Werten der präexistierenden Phosphate im Malz, die durch keine Tätigkeit der Phosphatasen vermehrt werden, zu tun haben. Und gerade daran war uns viel gelegen, eine Methode zu finden, die es gestattet, im Malz und ähnlichem Material die ursprünglich vorhandene Phosphorsäure, sowohl die gesamtlösliche wie die anorganische, zu bestimmen. Seit meiner früheren Untersuchung über die Phosphate im Malz hat sich F. Schönfeld[1]) in dankenswerter Weise damit beschäftigt, in zahlreichen Gersten Malzen und Würzen die einzelnen Gruppen der Phosphate festzustellen. Durch das eben untersuchte Verhalten der Phosphatasen gegen Alkohol glaube ich jetzt die gesamte Ausführung des Versuchs 16 aus Tabelle VIII als einfachste und schnellste Methode zur Bestimmung der präexistierenden Phosphate im Malz vorschlagen zu können:

Man setzt zu 30 g Malzmehl 90 ccm 96%igen Alkohol und 10 ccm Wasser hinzu und erwärmt etwa 20 Minuten auf 90°, wobei man solange als möglich rührt und den Becher mit einem Uhrglas bedeckt hält. Dann erhitzt man das umgebende Wasserbad sehr schnell zum Kochen und beläßt den Versuch nach Entfernung des Uhrglases noch 40 Minuten bei dieser Temperatur. Man zerdrückt die entstandenen Knollen mehrmals. Nach dem Abkühlen gibt man 270 ccm Wasser von Zimmertemperatur zu, rührt öfters mit der Hand durch und füllt nach mindestens 2 Stunden den Inhalt des Bechers auf 330 g auf. In je 50 ccm des Filtrats werden dann, wie eingangs unter „Methodisches“ erwähnt, die einzelnen Phosphatgruppen bestimmt.

Wirksamkeit der Phosphatasen.

Um die Kraft der Phosphatasen auch auf künstlich zugesetzte Phosphatverbindungen zu erproben, stellten wir in dieser Richtung Versuche an. Da wir die Enzyme nicht iso-

[1]) F. Schönfeld, Wochenschr. f. Brauerei **30**, 524, 1913; **31**, 37, 1914. — S. Sokolowski, ebenda **30**, 417, 1913; **31**, 105 u. 173, 1914. — R. Brodmerkel, ebenda **30**, 445, 1913.

lieren können, wollten wir einen frischen Malzauszug als enzymhaltiges Material verwenden. Es galt deshalb zuvor, überhaupt die Löslichkeit der Phosphatasen zu erweisen. Gibt es doch neben den sog. Sekretionsenzymen [1]), die auch außerhalb der Zelle zu wirken vermögen, eine zahlreiche Menge von Enzymen, die nur innerhalb der Zelle selbst sich betätigen können und Endoenzyme genannt werden. Ein einfacher Versuch sollte uns darüber aufklären: Es wurden 150 g Malzmehl mit 750 ccm Wasser von + 1° digeriert und unter öfterem Schütteln 7 Stunden bei dieser Temperatur stehen gelassen. Durch einen gekühlten Trichter wurde filtriert. Vom Filtrat, das eine Temperatur von 4° angenommen hatte, wurden je 50 ccm zur Phosphatbestimmung entnommen. Durch die Übersättigung mit Ammoniak zwecks Bestimmung der anorganischen Phosphorsäure war sicherlich eine Enzymtätigkeit ausgeschlossen. Eine andere Probe des kalten Extraktes wurde 16 Stunden auf 58° erwärmt, dann mit Wasser auf das ursprüngliche Gewicht wieder ergänzt, filtriert und auf 4° gebracht. Um Vergleichswerte mit der ersten Probe zu erzielen, pipettierte man bei dieser Temperatur 50 ccm zur Ermittelung der anorganischen Phosphate ab. Es ergab sich für 100 ccm Extrakt:

Ursprüngliche Probe:

Gesamte Phosphorsäure . . = 51,36 mg,
Anorganische Phosphorsäure = 39,60 mg = 77,10 % der gesamten Phosphorsäure.

Erwärmte Probe:

Anorganische Phosphorsäure = 43,88 mg = 85,44 % der gesamten Phosphorsäure.

Da wohl schon während der Extraktion die Enzyme etwas Gelegenheit fanden zu wirken und andererseits wegen der niedrigen Extraktionstemperatur die Löslichkeit sowohl der Enzyme wie der reaktionsfähigen Medien nicht hervorragend sein konnte, so ist die Zunahme in diesem Versuch, die über 8 % der anorganischen Phosphorsäure beträgt, als recht beträchtlich zu bezeichnen. Ein großer Teil wenigstens der Phosphatasen geht in Lösung und behält seine Wirksamkeit auch außerhalb der Zelle.

---

[1]) C. J. Lintner, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen **36**, 569, 1913.

Einwirkung auf enzymbefreites Malz. Zwei Proben von je 30 g unseres Malzmehls behandelten wir zwecks Vernichtung der Phosphatasen mit 85%igem Alkohol in der Hitze, wie vorher angegeben. Durch 6stündige Digestion von frischem Malzmehl mit etwa 5 Teilen Wasser bei Zimmertemperatur bereiteten wir einen enzymkräftigen Malzauszug. Von diesem setzten wir 50 ccm der einen Probe des enzymbefreiten Malzes zu. Zu der anderen Probe gaben wir ebenfalls 50 ccm des Malzauszugs zu, in dem aber vorher durch Kochen die Enzyme zerstört waren. Natürlich war nach dem Erhitzen des Malzauszugs wieder auf das ursprüngliche Gewicht aufgefüllt worden. Das koagulierte Eiweiß wurde nicht entfernt und mit in den Enzymversuch pipettiert. Zu beiden Proben setzte man außerdem noch 220 ccm Wasser und erwärmte dann 15 Stunden unter ständigem Rühren im Wasserbad auf 50°. Ebenso behandelte man auch eine Mischung von 50 ccm des frischen Malzauszugs mit 130 ccm Wasser. Da der Malzauszug nach Analyse 4,4 g Trockensubstanz in 100 ccm erhielt, wurde nach Beendigung der Versuchszeit auf 202,2 g aufgefüllt. Die beiden Malzproben ergänzte man mit Wasser auf 332,2 g. In den Filtraten führte man die üblichen Analysen aus. Auch der enzymbefreite Malzauszug wurde nach Entfernung des koagulierten Eiweißes untersucht.

Zur Berechnung der Enzymwirkung mußte der Wert des jeweils zugesetzten Malzauszugs vom betreffenden Gesamtergebnis abgezogen werden. Die so gewonnenen Resultate sind in Tabelle IX zusammengestellt.

Tabelle IX.

Einwirkung auf enzymbefreites Malz.

Enzymbefreites Malzmehl	% gesamtlösl. P_2O_5 berechnet auf:		% anorganische P_2O_5 berechnet auf:		
	Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	Malz	gesamte P_2O_5 im Malz	gesamtlösl. P_2O_5 im Malz
nach Einwirkung v. enzymkräftigem Malzauszug .	0,3334	53,09	0,2191	34,89	65,72
nach Einwirkung v. enzymbefreitem Malzauszug .	0,2201	35,05	0,0829	13,20	37,66
durch Enzymwirkung entstanden	0,1133	18,04	0,1362	21,69	—

Der frische Malzauszug lieferte für 50 ccm = 45,89 mg gesamte Phosphorsäure und 41,84 mg anorganische Phosphorsäure.

Der enzymbefreite Malzauszug (abgekocht) lieferte für 50 ccm = 40,68 mg anorganische Phosphorsäure.

Durch den enzymkräftigen Malzauszug erfuhr also sowohl die gesamtlösliche wie die anorganische Phosphorsäure des enzymbefreiten Malzmehls eine wesentliche Vermehrung. Der Malzauszug enthält demnach nicht nur, wie schon gezeigt, Enzyme, welche gelöste organische Phosphatkomplexe spalten, sondern auch solche, die unlösliche Phosphate in lösliche überführen. Dabei überwiegt die erstere Gattung bei weitem; denn das ganze Mehr an gesamtlöslicher Phosphorsäure in unserem Versuch rührt von der Zunahme der anorganischenPhosphate her.

Nicht unerwähnt soll bleiben, daß die Werte nach Einwirkung des enzymbefreiten Malzauszugs nur in der gesamtlöslichen Phosphorsäure eine Erhöhung aufweisen gegenüber den früheren Ergebnissen aus einem gleich vorbehandelten Material (Tabelle VIII, Versuch 20). Allerdings wurde damals nur Wasser zur Extraktion verwendet, was aber belanglos bleibt. Dadurch wird unsere frühere Annahme bestätigt, daß sich in der Wärme besonders hier bei dieser langen Extraktionsdauer, organische Phosphatverbindungen herauslösen.

Einwirkung auf Phytin. Von demselben Malzauszug, von dem enzymkräftigen wie von dem enzymbefreiten, den wir zu den vorhergehenden Versuchen verwendet hatten, ließen wir Proben gleichzeitig auch auf Phytin unter den genau gleichen Bedingungen einwirken. Wir benutzten dazu käufliches Phytin, das uns die Gesellschaft für chemische Industrie in Basel freundlichst überlassen hatte. Zweimal genau 0,5 g des feinst vermahlenen Präparates schlemmten wir in je 130 ccm Wasser auf und versetzten den einen Versuch mit 50 ccm des frischen, den anderen mit ebensoviel des abgekochten Mehlauszugs, der noch das koagulierte Protein enthielt. Man erwärmte 15 Stunden lang unter ständigem Rühren in einem Wasserbad von 50°. Dann wurde der Inhalt beider Becher auf je 202,7 g aufgefüllt (2,2 g = Trockensubstanz des Malzauszugs + 0,5 g = angewandtes Phytin) und filtriert. Beide Versuche zeigten schon bei der Fällung mit Magnesiamixtur äußerlich merkliche Unterschiede. Bei der enzymhaltigen Probe wies der Niederschlag

die normale, körnige Beschaffenheit auf, während die enzymfreie Probe einen schleimigen Niederschlag lieferte, der sich selbst nach 16 Stunden nicht vollkommen absetzte. Hier war also ein großer Teil des gelösten Phytins als solches vorhanden.

Zur Trennung der anorganischen Phosphorsäure vom Phytin wurde, wie früher angedeutet, vorgegangen. Den auf dem Filter gesammelten Niederschlag der Magnesiamixturfällung löste man in der Kälte mit unserer verdünnten schwefelsäurehaltigen Salpetersäure. Man erwärmte die Lösung auf etwa 50°, setzte wie vorgeschrieben die Lorenzsche Molybdänlösung zu und ließ 16 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Der Niederschlag war rein krystallinisch. M. A. Jegorow[1]) behauptet zwar, als er den Molybdänniederschlag von phytinhaltigen Lösungen auf Kohlenstoff untersuchte, daß „augenscheinlich eine kleine Menge des organischen Phosphorkomplexes darin zugegen“ sei Auch selbst wenn dem so wäre, spielt dies bei dem hohen Molekulargewicht des Niederschlags im Verhältnis zur vorhandenen Phosphorsäure fast keine Rolle. Daß erst ganz große Mengen an Phytin die Fällung der anorganischen Phosphate mittels Molybdänlösung stören, darauf weist auch Wo. Heubner[2]) hin. Da auch dieser Fall bei uns nicht in Betracht kommt, so wurde der nach v. Lorenz erzeugte Niederschlag wie üblich weiter behandelt, gewogen und berechnet.

Durch die bei der Fällung mit Molybdänlösung gewählte niedrigere Temperatur (50°) wird die Genauigkeit der Lorenz-Methode kaum beeinträchtigt. Eine Lösung anorganischer Phosphate ergab nach Vorschrift in der Hitze gefällt 35,37 mg P_2O_5; beim Erwärmen auf 50° erhielt man 34,91 mg P_2O_5. Das Filtrat der Molybdänfällung lieferte bei längerem Erhitzen auf 50° keine Ausscheidung.

Andererseits wird auch das Phytin beim Erwärmen auf 50° trotz der stark sauern Lösung nicht merklich angegriffen; ein 24stündiges Stehen bei Zimmertemperatur übt praktisch überhaupt keinen Einfluß aus. Das Filtrat einer phytinhaltigen Lösung, in der nach obiger Angabe die anorganischen Phosphate mit Molybdän bei 50° abgeschieden worden waren, zeigte

---

[1]) M. A. Jegorow, diese Zeitschr. 61, 41, 1914.

[2]) Wo. Heubner, diese Zeitschr. 64, 409, 1914.

nämlich erst nach 2 stündigem Erwärmen auf 50° einen schwachen, gelben Niederschlag, während beim Stehenlassen in der Kälte dies erst nach etwa 3 Tagen eintrat.

Über die Zersetzlichkeit des Phytins finden sich die widersprechendsten Ansichten. M. A. Jegorow[1]) nennt das Phytin sehr wenig widerstandsfähig; Starkenstein[2]) fand, daß sich das Phytin schon beim Trocknen auf 100° zersetzt. Wo. Heubner (l. c.) dagegen bezeichnet ein Erwärmen auf 37° in saurer Lösung als nicht schädlich; in einer andern Arbeit[3]) findet derselbe Forscher sogar ein schwaches Erhitzen kaum störend. Eine ähnliche Ansicht vertritt W. Vorbrodt[4]). Nach den bisher gemachten Erfahrungen glaube ich, daß die Angaben der letztgenannten Forscher den Tatsachen am nächsten kommen, wenigstens was das Phytin des Handels betrifft. Der mit der Molybdänlösung unter den erwähnten Vorsichtsmaßregeln erzeugte Niederschlag enthält sicher nur die neben dem Phytin vorhandene anorganische Phosphorsäure. Die Behauptung M. A. Jegorows (l. c.), niemals mittels Molybdänlösung die anorganische Phosphorsäure im Phytin nachweisen zu dürfen, läßt sich wohl nicht für alle Verhältnisse aufrechterhalten.

In unserem vorliegenden Fall handelte es sich ja nicht so sehr darum, den quantitativen Verlauf einer Enzymwirkung festzustellen, als überhaupt eine solche zu zeigen. Nach den angegebenen Methoden ermittelte man nun in beiden Versuchen die anorganische Phosphorsäure. Von den erhaltenen Resultaten wurden die entsprechenden Werte der mit dem jeweiligen Malzauszug hinzugekommenen Phosphate abgezogen. Die so berechneten Ergebnisse sind in Tabelle X enthalten.

Das verwendete Phytin lieferte bei der Veraschung 39,47% gesamte P_2O_5.

Fast die ganze Menge des angewandten Phytins ist bei unseren Versuchen in Lösung gegangen. Selbst in der enzymfreien Probe war die Lösung vorzüglich, jedenfalls weit besser als mit Wasser allein; denn die schwach saure Reaktion des

[1]) M. A. Jegorow, diese Zeitschr. **42**, 432, 1912.

[2]) Starkenstein, diese Zeitschr. **30**, 56, 1911.

[3]) Wo. Heubner, diese Zeitschr. **64**, 401, 1914.

[4]) W. Vorbrodt, Bull. de l'Acad. de Cracovie, math.-nat. Kl., Reihe A, 418, **1910**.

Tabelle X.

Einwirkung auf Phytin.

Phytin	% gesamtlösl. P_2O_5 berechnet auf:		% anorganische P_2O_5 berechnet auf:		
	Phytin	gesamte P_2O_5 im Phytin	Phytin	gesamte P_2O_5 im Phytin	gesamtlösl. P_2O_5 i. Phytin
nach Einwirkung v. enzymkräftigem Malzauszug .	37,07	93,92	27,87	70,61	75,18
nach Einwirkung v. enzymbefreitem Malzauszug .	33,64	85,23	10,04	25,44	29,85
durch Enzymwirkung entstanden	3,43	8,69	17,83	45,17	—

Malzauszugs und die Anwesenheit der Kolloide wirkte teils lösend, teils adsorbierend auf das Phytin ein. Eine kleine Menge des Phytins blieb ungelöst, was man auch deutlich bei der Filtration wahrnehmen konnte. Es werden dies wohl zum Teil anorganische Calcium- bzw. Magnesiumphosphate gewesen sein, die sich als Verunreinigungen oder Zersetzungsprodukte im käuflichen Phytin vorfanden.

Während also die Tätigkeit von Enzymen bei der Bildung der gesamtlöslichen Phosphorsäure nur wenig in die Erscheinung tritt, zeigt sich die Wirkung der Phosphatasen äußerst stark bei den Werten der anorganischen Phosphorsäure. Die Zunahme beträgt über 45% der gesamten Phosphorsäure. Daß auch schon der enzymfreie Versuch anorganische Phosphate lieferte, rührt von ursprünglich vorhandenen anorganischen Phosphaten im Phytin her, die bei der langen Versuchsdauer infolge von Zersetzung noch vermehrt wurden. Auch Jegorow (l. c.) und Starkenstein (l. c.) bezeichnen rund 20% des Phytins des Handels als fällbar durch Molybdänlösung. Dieser fällbare Teil ist meiner Meinung nach nichts anderes als ein anorganischer Bestandteil im Phytin, wobei ich die Frage nach seiner Entstehung vorläufig unbeantwortet lassen möchte.

Der große Unterschied zwischen anorganischer und gesamtlöslicher Phosphorsäure im enzymfreien Versuch läßt erkennen, daß hier eine bedeutende Menge ungespaltenen Phytins gelöst sein muß. Auch experimentell zeigte sich dies, als man dem Filtrat der Molybdänfällung der anorganischen Phosphorsäure nach dem Übersättigen mit Ammoniak Magnesiamixtur zusetzte.

Es fiel dadurch ein voluminöser, amorpher, weißer Niederschlag aus, den wir als Phytin identifizierten. In dem enzymhaltigen Versuch ließ sich bei der gleichen Behandlung dieser Körper nicht gewinnen, wenn auch sicherlich noch etwas unzersetztes Phytin darin vorhanden war.

Mit diesen Versuchen ist also die Anwesenheit der zur Gruppe der Phosphatasen gehörigen Phytase im Malz bewiesen. Dieses Enzym wollen auch U. Suzuki, K. Joshimura und M. Takaishi[1]) in der Reiskleie nachgewiesen und isoliert haben. M. A. Jegorow (l. c.) bezeichnet die Untersuchungen dieser Forscher deshalb als nicht einwandfrei, weil unter den gleichen Versuchsbedingungen Wasser allein das Phytin schon ebenso gespalten hätte, wie es bei der vermeintlichen Phytase der Fall war. Dieser Einwand läßt sich bei unserer Versuchsanordnung wohl nicht erheben. Von besonderem Interesse wäre es nun, nach der Einwirkung der Enzyme in der Lösung die zweite Komponente des Phytins, den Inosit, feststellen zu können; denn wenn dem Phytin wirklich die von C. Neuberg[2]) und auch von Starkenstein (l. c.) vorgeschlagene Formel einer Inositphosphorsäure zukommt, so muß dies gelingen. Damit wäre dann die frühere Annahme von S. Posternak[3]), daß das Phytin als ein Derivat des Formaldehyds erst beim Erhitzen mit starken Säuren den Inosit liefere, endgültig erledigt. Vielleicht wird dieser Nachweis eher ermöglicht, wenn es glückt, die Phytase aus dem Malz abzusondern. Wir beabsichtigen, uns mit der Isolierung der Phosphatasen und speziell der Phytase aus dem Malz zu befassen, um dann unter Umständen der Untersuchung über die Zusammensetzung des Phytins in der eben angedeuteten Weise nähertreten zu können.

In Anbetracht der Tätigkeit der Malzphytase ist es mehr als unwahrscheinlich geworden, daß im fertigen Bier noch ungespaltenes Phytin vorhanden sein kann. Denn wenn auch beim Herstellungsprozeß während der Extraktion teils wegen der starken Konzentration teils wegen der angewandten Tem-

---

[1]) U. Suzuki, K. Joshimura und M. Takaishi, Bull. of the Coll. of Agric. Tokyo **7**, 504, 1907.

[2]) C. Neuberg, diese Zeitschr. **5**, 443, 1907; **9**, 557, 1908; **61**, 187, 1914.

[3]) S. Posternak, Compt. rend. **137**, 439, 1903; Rev. gén. de Botan. **12**, 5, 1900.

peraturen und anderen Gründen nicht die für die Phytasewirkung günstigsten Bedingungen herrschen, so geht andererseits auch nur eine kleine Menge der organischen Phosphate (Phytin) in Lösung. So lieferte eine Laboratoriumskongreßmaische, ein Extraktionsverfahren, das der Praxis am nächsten kommt, für unser Malzmehl folgende Werte:

an gesamtlösl. $P_2O_5 = 0{,}3982\,^0/_0$ des Malzes $= 63{,}41\,^0/_0$ der gesamten P_2O_5 im Malz;

an anorganischer $P_2O_5 = 0{,}3004\,^0/_0$ des Malzes $= 47{,}77\,^0/_0$ der gesamten P_2O_5 im Malz $= 75{,}54\,^0/_0$ der gesamtlösl. P_2O_5 im Malz.

Ein großer Teil der organischen Phosphate und damit des Phytins bleibt, wie auch ein Vergleich mit den früheren Extraktionen unter besseren Bedingungen erkennen läßt, ungelöst. In dem ausgelaugten Rückstand des Malzschrotes (Trebern) kann man das Phytin nachweisen. Das in den Extrakt übergegangene Phytin wird infolge der großen Wirksamkeit der Phytase des Malzes, wie wir sie eben kennen lernten, in seine Bestandteile zerlegt. Damit verliert die Behauptung von W. Windisch und H. Reiser[1]), im Bier Phytin gefunden zu haben, besonders auch in Berücksichtigung ihrer schon seinerzeit von uns[2]) angezweifelten Methodik nun noch den Rest an Wahrscheinlichkeit.

Zum Schluß sei noch ein kurzer Vergleich der Phosphatasen mit den säurebildenden Enzymen im Malz angestellt. Da nach der allgemeinen Ansicht die in Malzextrakten vorhandene Säure in erster Linie von der Menge und Art der Phosphate abhängt, so sollte man erwarten dürfen, daß die Wirkungsbedingungen der säurebildenden Enzyme, die wir in einer früheren (l. c.) Abhandlung studierten, denen der Phosphatasen sehr ähnlich sind. Dies trifft aber keineswegs zu, besonders was den Einfluß der Konzentration und der Temperatur anbelangt. Der Zusammensetzung der bei der Säurebildung bzw. Phosphatasewirkung entstehenden Phosphate kann die Schuld nicht zugeschrieben werden, da in beiden Fällen bei wechselnden Extraktionsbedingungen fast stets die gleiche Wasserstoffionenkonzentration herrscht; damit ist ja das Verhältnis von sekundärem zu primärem Phosphat ziemlich festgelegt. Die

---

[1]) W. Windisch und H. Reiser, Wochenschr. f. Brauerei **29**, 299, 1912.

[2]) L. Adler, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen **35**, 325, 1912.

einzige Veränderliche bleibt somit die Menge der Phosphate. Es sind demnach an der Säureentstehung außer den Phosphaten noch andere Stoffe beteiligt. Darunter spielen sicher die Eiweißkörper und ihre Abbauprodukte, die Aminosäuren, eine bedeutende Rolle, besonders wenn man bedenkt, daß wir wegen der Phosphate Phenolphthalein zur Festlegung des Neutralpunkts ($p_H = 9{,}1$) wählten. Je mehr von diesen schon fast auf Lackmus ($p_H = 6{,}8$) neutral reagierenden Stoffen vorhanden war, um so mehr Lauge verbrauchten wir bis zum gewünschten Umschlag unseres Indicators. Wenn unsere Vermutung über den Einfluß der Eiweißkörper und seiner Spaltprodukte richtig ist, dann müssen die Wirkungsbedingungen der Enzyme, die an der Lösung und dem Abbau dieser Körper beteiligt sind, die Resultante vorstellen aus der Tätigkeit der säurebildenden Enzyme und der Phosphatasen. Zum Teil ist dies auch der Fall. Anläßlich unserer Untersuchung über die polypeptidliefernden und aminosäurebildenden Enzyme des Malzes fanden wir als Optimumtemperatur 46° und für die Phosphatasen erhielten wir in vorliegender Arbeit einen Wert von 58°. Da die Optimumtemperatur für die Säurebildung 53° beträgt, hält sie also tatsächlich fast genau die Mitte.

Zusammenfassung.

Wir haben es im Malz mit mindestens zwei Arten von Phosphatasen zu tun, von denen die eine unlösliche organische Phosphatkomplexe in Lösung bringt, während die andere anorganische Phosphate bildet. Die Wirkung ist wahrscheinlich stufenförmig.

Das Temperaturoptimum liegt für die Phosphatasen bei 58°. Eine Erhöhung der Temperatur beeinträchtigt ihre Tätigkeit sofort, während eine Erniedrigung bis auf 43° kaum von Einfluß ist.

Die Enzyme, welche die löslichen Phosphate entstehen lassen, stellen praktisch nach 5 Stunden ihre Wirksamkeit ein; bei den die anorganischen Phosphate liefernden Enzymen tritt dies erst nach 14 Stunden ein.

Die Tätigkeit der Phosphatasen hängt stark von der Konzentration der Lösung ab, da eine große Viscosität derselben sowie auch die Anreicherung der Reaktionsprodukte (der an-

organischen Phosphate) schädlich wirkt. In einem Extrakt von 1 Teil Malz mit 20 Teilen Wasser findet der beste Abbau statt. Bei stärkerer Verdünnung nimmt die Bildung der anorganischen Phosphate ab.

Die größte Bedeutung kommt der Wasserstoffionenkonzentration zu. Bei einem $p_{H^{\cdot}} = 5{,}4$ läßt sich die gesamte Phosphorsäure des Malzes in Lösung bringen, wovon etwa 93% anorganischer Natur sind. Gegen Hydroxylionen sind die Phosphatasen weit empfindlicher als gegen Wasserstoffionen. Bei stark saurer Reaktion ($p_{H^{\cdot}} = 2{,}0$) geht aus dem Malz eine organische Phosphorverbindung in Lösung, das Phytin.

Die Phosphatasen sind ziemlich widerstandsfähig gegen eine Behandlung mit Alkohol in der Hitze. Zur Vernichtung der Enzyme wendet man am besten eine Abkochung mit etwa 85%igem Alkohol an. Bei der nachherigen wässerigen Extraktion bei Zimmertemperatur findet keine Enzymtätigkeit mehr statt. Auf diese Arbeitsweise wurde eine Methode zur Bestimmung der präexistierenden Phosphate im Malz gegründet.

Die Malzphosphatasen sind Sekretionsenzyme, sie sind löslich und wirken auch außerhalb der Zelle.

Unter den Phosphatasen spielt eine Hauptrolle die Phytase, die das in den Spelzen des Korns enthaltene Phytin in seine Bestandteile zerlegt. Auch auf künstlich zugesetztes Phytin des Handels vermag sie zu wirken.

Über den Indolgehalt der Verdauungsprodukte von Fibrin und Casein.

Von

W. von Moraczewski.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Medizinischen Klinik in Zürich.)

(Eingegangen am 6. März 1915.)

In einer früheren Arbeit[1]) habe ich versucht, durch Bestimmung der Indolmenge in den Fäulnisprodukten die verschiedenen Eiweißkörper zu charakterisieren. Ich glaubte damit ein Mittel zu geben, die Zusammensetzung der Eiweißkörper zu überblicken, ein Mittel, das neben den anderen chemischen Methoden wohl Platz finden dürfte. Die Indolbestimmung hat gewiß viele Ungenauigkeiten und ist nicht fehlerfrei, sie hat aber den Vorzug, sehr einfach und handlich zu sein, und schließlich gibt sie bei einer gewissen Übung ebenso sichere Werte wie die anderen Methoden. Vergleicht man nämlich die Angaben über die Zusammensetzung der Eiweißkörper und ihren Gehalt an Amidosäuren, so findet man recht große Abweichungen, die wohl gerechtfertigt sind durch die Schwierigkeiten der Abscheidung der betreffenden Körper und durch die mehr oder weniger eingreifenden Prozeduren. Die Indolbestimmungsmethode ist für die abgespaltenen Polypeptide schonend.

Hier geschieht die Abscheidung erst durch Verdauung, dann durch Destillation; die Bestimmung durch das Calorimeter, die Bildung durch Fäulnis. Alle diese Mittel sind ziemlich zuverläßlich, wenn man sie unter möglichst gleichmäßigen Bedingungen ausführt.

Bei der Bestimmung des Indols in den Eiweißarten fiel es mir nun auf, daß das Witte-Pepton weitaus die größten Indol-

[1]) Diese Zeitschr. 51, 340.

werte lieferte, und ich dachte, daß vielleicht die Verdauung gewisse tryptophanreiche Gruppen abspalte, einen tryptophanarmen Kern zurücklassend. Um dieses zu prüfen, unternahm ich die Versuche, über die hier berichtet wird, die zugleich zeigen sollen, daß die Indolbestimmungsmethode wohl geeignet ist, über derartige Fragen Antwort zu geben.

Ich nahm zwei Eiweißkörper in Arbeit: das Casein, das mir für die früheren Versuche diente und das ich sozusagen genau kannte, und das Blutfibrin, da letzteres zur Herstellung des Witte-Peptons wohl am meisten benutzt wird.

Die Verdauung geschah nach früheren Vorschriften, die in der obengenannten Arbeit beschrieben sind. Das Casein resp. Fibrin wurde in $^{n}/_{10}$-Salzsäure gelöst oder suspendiert auf 5 bis 10 g Eiweiß, 1 bis 2 g Pepsin zugesetzt und 24 Stunden einer peptischen Verdauung überlassen. Die Flüssigkeitsmenge betrug immer 300 ccm. Nach der Verdauung wurde die Salzsäure durch eine genau der Salzsäure entsprechende Natronlauge neutralisiert, darauf $^{n}/_{2}$-Sodalösung zugesetzt und alles auf 500 ccm gebracht, mit 1 bis 2 g Pankreatin wurde schließlich das Ganze einer neuerlichen Verdauung überlassen. Nach 24 Stunden wurde die Verdauungsflüssigkeit mit frischem Menschenstuhl geimpft, wobei ein erbsengroßes Stück reichlich genügt. Die nunmehr eintretende Fäulnis dauerte 24 bis 48 Stunden. Sollte infolge von Anwesenheit von Zucker eine Gärung auftreten und die Flüssigkeit sauer reagieren, so wurde die Flüssigkeit durch Soda alkalisiert. — Es mag nochmals hervorgehoben werden, was auch in der früheren Arbeit betont wurde, daß bei der Verdauung manches von untergeordneter, manches aber von hervorragender Bedeutung ist: gleichgültig ist die Menge der Substanz, gleichgültig die peptische Verdauung; dagegen maßgebend die tryptische Verdauung und die Fäulnis. Die tryptische Verdauung muß so geführt werden, daß das Ferment seine volle Tätigkeit entwickeln kann. Es darf der Zusatz von Pancreatin erst zur fertigen Flüssigkeit geschehen, nicht etwa zur sauren Lösung, die nachträglich neutralisiert und alkalisiert wird, auch nicht zu der Sodalösung, denn beides schädigt das ungemein empfindliche Enzym. Ist die Verdauung richtig angeleitet, dann genügen 2 Stunden, um alle tryptophan- oder indolliefernden Gruppen abzuspalten. Ist die Ab-

spaltung nicht vollständig, dann kann man keine quantitative Indolabspaltung erwarten. Ebenso wichtig, vielleicht noch empfindlicher ist die bakterielle Wirkung. Der Stuhl muß vor allem frisch sein, er darf nicht lange an der Luft verweilen; er darf aber auch nicht von einem Menschen stammen, der Abweichungen hat, oder viel Vegetabilien genießt. Oft wurde beobachtet, daß der Stuhl des gleichen Individuums verschiedene Indolmengen liefert, je nachdem der Betreffende viel oder wenig Obst genossen hat. Vegetabilien machen eben die Bakterien weniger virulent oder weniger zahlreich, und ein Stuhl, nach Obst und Vegetabilien gewonnen, zersetzt das Tryptophan weniger energisch. — Es wäre ein leichtes, den Stuhl durch Bakterienstämme zu ersetzen, aber auch diese Kulturen sind sehr wechselnd in ihrer Wirkung und wohl umständlicher zu gewinnen. — Die zweite Bedingung einer richtigen und vollständigen Indolabspaltung ist die Reaktion der Fäulnis.

Das aus Milch gewonnene Casein kann durch den Milchzuckergehalt eine Kohlensäureentwicklung und Gärung veranlassen, und es muß dafür gesorgt werden, daß die gebildeten organischen Säuren mit Soda abgestumpft werden. — Berücksichtigt man die obengenannten Bedingungen, so gewinnt man gleichmäßige und eindeutige Werte.

Die von mir untersuchten zwei Eiweißkörper, Blutfibrin aus Rinderblut und Milchcasein, zeigen nun durchgreifende Verschiedenheit. Blutfibrin spaltet bei der Verdauung gleichmäßig zusammengesetzte Produkte ab, die bei weiterer Verdauung gleiche Mengen Indol liefern; das Casein dagegen spaltet sogenannte Caseosen ab, die bei der Verdauung mehr Indol liefern als das zurückgebliebene Paranuclein.

Dieses ist aus der angeführten kleinen Tabelle ohne weiteres ersichtlich. Die verschiedenen Eiweißmengen, die in Arbeit genommen wurden, üben, wie man leicht ersieht, keinen Einfluß aus. Es wurde die Konzentration der Verdauungsprodukte absichtlich mehrfach modifiziert, indem man die Stammlösung auf die Hälfte und auf ein Drittel verdünnte. In jeder solchen Portion wurde nun die tryptische Verdauung und die Fäulnis unter sonst gleichen Bedingungen geführt. Auf 1 g Stickstoff bekam man stets die gleiche Indolmenge. Somit darf man als ziemlich

Casein	N des Caseins	Indol-menge	auf 1 g N Indol
Caseosen	1,365[2])	0,102	0,073
Nuclein	1,035[3])	0,054	0,050
I. Caseosen	0,914	0,0249	0,027
II. Caseosen	0,665	0,0375	0,058
III. Caseosen	0,232	0,0075	0,033
Nuclein	0,525	0,0084	0,016
Caseosen	0,521	0,0249	0,048
Nuclein	0,070	0,0019	0,028
Caseosen	0,350	0,0084	0,025
Nuclein	0,070	0,0001	0,014
Caseosen	0,245	0,0180	0,073
Nuclein	0,140	0,0084	0,060
Caseosen	0,280	0,0099	0,036
Nuclein	0,084	0,0009	0,0107
Eieralbumin			
Albumin	0,210	0,0060	0,028
Peptone	0,658	0,0105	0,016
I. Peptone	0,322	0,0075	0,023
Peptone	0,455	0,0110	0,022
Peptone	0,560	0,0150	0,027

Fibrin: N des Fibrins	Indol-menge	auf 1 g N Indol	
0,399	0,0100	0,034	Fibrinose
0,056	0,0015	0,027	Rest
0,080	0,015	0,180	Fibrinose
0,161	0,024	0,150	Rest
0,147	0,027	0,185	Fibrinose
0,371	0,060	0,173	Rest
0,266	0,054	0,198	Fibrinose
0,472	0,099	0,209	Rest
0,658	0,0150	0,023	I. Fibrinose
0,237[1])	0,0102	0,040	II. Fibrinose
0,539	0,034	0,060	I. Fibrinose
0,518	0,036	0,060	II. Fibrinose
0,161	0,013	0,070	III. Fibrinose
0,700	0,0375	0,053	Fibrinose mit HCl
0,490	0,0300	0,061	Fibrinose mit HCl
0,266	0,0130	0,051	Fibrinose mit HCl
0,770	0,060	0,085	I. Fibrinose
0,535	0,048	0,091	II. Fibrinose
0,280	0,042	0,150	I. Rest'
0,175	0,024	0,140	II. Rest

sicher annehmen, daß sowohl die Verdauung wie das Abdestillieren des Indols in den von uns gewählten Grenzen vollständig zu Ende geht.[4])

Die Indolmengen wurden stets auf 1 g Stickstoff bezogen, und deshalb wurden von den 500 ccm, die bereits zu Fäulnis angesetzt waren, 20 ccm für eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl genommen und daraus die in 500 ccm enthaltene N-Menge berechnet. Von den 500 ccm wurden stets 300 ccm abdestilliert und durch 2°/₀₀ige Natriumnitritlösung die Nitroindolfärbung erzeugt, die mit einer gleichen Färbung von einer 0,000001 Indol auf 1 ccm enthaltenden Lösung verglichen wurde.

Die Caseosen wurden so hergestellt, daß nach einer kurzen Pepsinverdauung das Casein abfiltriert wurde, und nunmehr

[1]) 0,237 bis 0,0037 g Tryptophan; auf 1 g N 0,0135 g Tryptophan.
[2]) 1,365 bis 0,055 g Tryptophan; auf 1 g N 0,0405 g Tryptophan.
[3]) 1,035 bis 0,041 g Tryptophan; auf 1 g N 0,038 g Tryptophan.
[4]) Die Tabelle enthält Durchschnittswerte aus je drei bis vier übereinstimmenden Versuchen, die, um nicht die Tabelle zu sehr auszudehnen, weggelassen sind.

durch Erhitzen und Ansäuern mit Essigsäure koaguliert. Dieses so koagulierte Eiweiß wurde als Caseosen I bezeichnet. Das Filtrat lieferte sodann die Caseosen II. Der bei der peptischen Verdauung ungelöste Rest ist Paranuclein. Es ist dabei von einer vollständigen Trennung dieser Verdauungsprodukte abgesehen.

Ähnlich verfuhr ich bei Trennung der Fibrinverdauung: Auch hier wurde in manchen Versuchen nur das zuerst gelöste Fibrin von dem ungelösten abgetrennt. In den anderen Fällen wurde nach der Abfiltrierung des zuerst gelösten der Rest einer weiteren peptischen Verdauung überlassen und etwa nach 24 Stunden Verdauung abermals abfiltriert. Das nach der zweiten Verdauung Zurückgebliebene wurde nun Rest genannt.

Ein Versuch wurde mit frischem Eieralbumin gemacht. Auch hier wurden die Verdauungsprodukte durch Koagulation getrennt, das Koagulierte besonders verdaut, die Albumosen einer weiteren Verdauung überlassen und in jeder Portion die tryptische Verdauung und die Fäulnis durchgeführt. Hier scheinen die Albumosen reichlicher Indol liefernde Gruppen zu enthalten als die unverdauten Produkte.

Ich führe einige Versuche als Beispiel an, die übrigen bringe ich in der Tabelle.

Versuch 1.

30 g Eierklar in 1500 ccm $^{n}/_{10}$-Salzsäure gelöst und 5 g Pepsinum germanicum zugesetzt.

Nach 24 Stunden abfiltriert und aufgekocht.

a) Das Filtrat gibt auf 1 g N 0,015 g Indol. (0,7 g N gaben 0,0108 g Indol.)

Das koagulierte Eiweiß gibt auf 1 g N 0,0023 g Indol. (0,322 g N gaben 0,00075 g Indol.)

b) Das Filtrat gibt auf 1 g N 0,015 g Indol.

Das koagulierte Eiweiß gibt auf 1 g N 0,0027 g Indol.

Versuch 2.

5 g Casein in 300 ccm HCl gelöst, nach 24 Stunden 150 ccm abfiltriert, auf 500 ccm gebracht, mit Soda und Pankreatin verdaut, dann der Fäulnis überlassen.

In 500 ccm: 0,325 g N geben 0,0090 g Indol.
1 g N gibt 0,0278 g "

Der unverdaute Rest auf 500 ccm gebracht, mit Pankreatin verdaut, dann zum Faulen gebracht.

In 500 ccm: 0,084 g N geben 0,00089 g Indol.
1 g N gibt 0,0107 g „

Versuch 3.

30 g feuchtes Fibrin in HCl aufgelöst, nach 1 Stunde abfiltriert, koaguliert. Das Koagulat mit HCl und Pepsin, dann mit Pankreatin und Soda verdaut, mit Kot geimpft.

In 500 ccm: 0,518 g N geben 0,0360 g Indol.
1 g N gibt 0,064 g „

Das Unkoagulierte mit HCl und Pepsin, dann mit Soda und Pankreatin verdaut, gefault.

In 500 ccm: 0,700 g N geben 0,0375 g Indol.
1 g N gibt 0,053 g „

Das Ungelöste mit HCl 24 Stunden verdaut, dann mit Soda und Pankreatin, dann gefault.

In 500 ccm: a) 0,28 g N geben 0,042 g Indol.
1 g N gibt 0,15 g „
b) 0,175 g N geben 0,024 g „
1 g N gibt 0,14 g „

In einzelnen Fällen habe ich neben der Indolbestimmung auch eine Tryptophanbestimmung gemacht, indem ich 50 ccm der Lösung, die tryptische Verdauungsprodukte enthielt, mit 40 ccm Ehrlichs Reagens (Paradimethylamidobenzaldehyd in Salzsäure gelöst) versetzte und auf 100 ccm mit konzentrierter Salzsäure auffüllte[1]). Nach 48 bis 80 Stunden wurde die tiefviolett gefärbte Lösung mit einer blauen Standardlösung, die 0,1 mg Tryptophan anzeigte, verglichen. — Diese Bestimmungen dienten nur zur Kontrolle und ergaben gleichlautende Resultate. So war in den Caseosen nach dieser Bestimmung mehr Tryptophan als im Paranuclein enthalten. Vergleicht man die auf

[1]) 20 g p-Dimethylaminobenzaldehyd,
500 ccm konz. HCl,
500 ccm H_2O,
nach E. Herzfeld (diese Zeitschr. 56, 261, 1913. Die von E. Herzfeld für Witte-Pepton, Casein, Albumin usw. gefundenen Tryptophanwerte gehen der von mir gefundenen Indolmenge in denselben Eiweißarten vollkommen parallel.

diese Weise gewonnenen Mengen, so findet man stets weniger Tryptophan, als man nach der Indolbestimmung erwarten sollte.

Entweder sind nicht alle Polypeptide in der zur Fäulnis bestimmten Lösung gespalten, oder die Methode ergibt nicht die richtigen Werte. Jedenfalls interessierte uns hier hauptsächlich der Unterschied zwischen Fibrinosen und Fibrin einerseits, Caseosen und Paranuclein andererseits — und dieser Unterschied wurde in gleichem Sinne gefunden wie mit der Indolbestimmung.

Es erübrigt noch, ein Wort darüber zu sagen, warum die Indolmengen doch recht schwankend sind und warum das Casein, das nach unseren früheren Befunden stets 0,030 g Indol auf 1 g Stickstoff lieferte, in diesen Versuchen zuweilen höhere Zahlen gab. Es liegt dies daran, daß wir früher mit einem trockenen Caseinpulver, dem sog. Caseinum purissimum nach Hammarsten von E. Merck gearbeitet haben. Dieses Präparat liefert konstant den eben genannten Wert. Bei den jetzigen Versuchen arbeiteten wir mit roher Milch; die Abscheidung des Caseins war ganz grob, es wurde von den Milchalbumosen nicht entsprechend gereinigt, da dieses für uns nebensächlich war. Somit war neben Casein wohl auch Lactalbumin vorhanden. Die Milch war verschieden zusammengesetzt, wir brauchten bald entfettete, zentrifugierte Milch, bald Vollmilch. Dieser Umstand möge die schwankenden Zahlen rechtfertigen. — Wenn das Fibrin nicht immer die maximalen Werte 0,15 g Indol auf 1 g Stickstoff erreicht, so liegt dies an der mehr oder weniger vollkommenen Fäulnis. Selbstverständlich haben wir die Fäulnisbedingungen da, wo es sich um Vergleichung der Spaltungsprodukte handelte, genau gleichgemacht und auch dort gleiche Zahlen erhalten. So gibt es Serien von Fibrinen, die weniger Indol liefern, und solche, die das Maximum erreichen. Stets zeigen aber alle Spaltungsprodukte in solchen Fällen die gleiche Indolmenge. Das Blutfibrin wurde aus dem Schlachthause von Fall zu Fall geholt. Es kann sein, daß es nicht immer gleichwertig ist. Jedenfalls muß nochmals hervorgehoben werden, daß die in der Tabelle enthaltenen Werte Durchschnittszahlen von vielen, zumeist von drei gut übereinstimmenden Bestimmungen sind.

Es sei mir erlaubt, hier zu erwähnen, daß ich vor etwa 20 Jahren über den Phosphorgehalt des Caseins und seiner

Verdauungsprodukte geschrieben habe[1]) und in dieser Arbeit, die unter E. Drechsels Leitung gemacht war, zeigte, daß das Casein in einen phosphorreichen Kern und eine phosphorarme Lösung bei der peptischen Verdauung zerfällt. Das Nuclein als Kern war um so phosphorreicher, je verdünnter die Lösung und je geringer der unverdaute Rest.

Nach einiger Zeit untersuchte ich dann, wie sich der Schwefel des Caseins bei peptischer Verdauung verhalte[2]). Es ergab sich, daß das Casein bei der Verdauung immer in gleichmäßig schwefelhaltige Körper zerfällt. Sowohl das Nuclein wie die Caseosen haben prozentisch den gleichen Schwefelgehalt. Die Verdünnung hatte hierbei keinen Einfluß, ob der unverdaute Kern gering, phosphorreich, ob groß und phosphorarm, sein Schwefelgehalt war immer annähernd konstant.

Die Tryptophan- oder Indolgruppe verhält sich nun anders. Das Casein zerfällt nach der letzten Untersuchung in einen indolarmen Rest und indolreiche Caseosen. Die Verdünnung ist dabei ohne Einfluß. Immer ist der phosphorreiche Kern indolärmer, die phosphorarmen Caseosen indolreicher.

Abderhaldens Versuche ergeben, daß bei der Ernährung mit den Zerfallsprodukten die Tryptophangruppe mit die wichtigste Rolle spielt. Es ist vielleicht kein Zufall, daß das Blutfibrin der indolreichste Eiweißkörper ist. Auch die indol- und tryptophanreichen Verdauungsprodukte, die bei Casein und Eieralbumin gefunden wurden, gewinnen hiermit an Bedeutung für den verwickelten Prozeß der Ernährung und des Aufbaus der Organismen.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **20**, 28.

[2]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **5**, 489.

Neue Untersuchungen über die physikalisch-chemische Regulierung der Atmung.

Von

Hans Winterstein.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 12. März 1915.)

Mit 8 Figuren im Text.

1. Literatur.

Im Jahre 1910 habe ich[1]) die Theorie aufgestellt, „daß weder der Sauerstoffmangel noch die Kohlensäurespannung als solche, sondern einzig und allein die Wasserstoff-Ionen-Konzentration des Blutes die chemische Regulierung der Atmung besorgen". Die experimentelle Grundlage dieser Theorie, die mir das gesamte umfangreiche, bis dahin vorliegende Tatsachenmaterial in befriedigender Weise zu erklären schien, bildete die Beobachtung, daß bei künstlicher Durchspülung neugeborener Säugetiere mit einer CO_2-freien Lösung (mit oder ohne Sauerstoff) bei Zimmertemperatur dauernd Apnoe besteht, während bei Verwendung CO_2-haltiger Lösungen, ebenso aber auch bei Zusatz anderer Säuren (Salzsäure, Weinsäure u. a.), zu der CO_2-freien Durchspülungsflüssigkeit rhythmische Atembewegungen auftreten[2]);

[1]) H. Winterstein, Die Regulierung der Atmung durch das Blut. VIII. Internat. Physiologenkongreß, Wien 1910. Arch. f. d. ges. Physiol. 138, 167, 1911.

[2]) Die Erregung des Atemzentrums bei Injektion von Säuren in die Blutbahn ist zuerst 1877 von Walther (Untersuchungen über die Wirkung von Säuren auf den tierischen Organismus. Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 7, 148) beobachtet worden und nach ihm von zahlreichen anderen Autoren. Da das Einbringen von Säure in das Blut das CO_2-Bindungsvermögen desselben herabsetzen muß, so liegt der Gedanke nahe, daß hiermit eine Steigerung der CO_2-Tension einhergehe (die mit der

mithin schien der erregende Einfluß der Kohlensäure nicht auf einer spezifischen Wirkung, sondern einfach auf ihrer Säurenatur zu beruhen, d. h. auf der Steigerung der Wasserstoff-Ionen-Konzentration ([H˙]), auf welchen Faktor sich auch die Wirkung des O-Mangels unschwer zurückführen ließ.

Eine glückliche Ergänzung dieser Theorie erfolgte durch die Arbeit von Porges, Leimdörfer und Markovici[1]), die gleichzeitig und unabhängig von mir von klinischen Erfah-

---

von Walther und anderen nachgewiesenen Herabsetzung des CO_2-Gehaltes sehr wohl vereinbar wäre) und daß diese die Steigerung der Atemtätigkeit bedinge. Erst durch die mit karbonatfreien Lösungen angestellten Versuche wurde erwiesen, daß die Steigerung der [H˙] unabhängig von einer Änderung der CO_2-Tension erregend wirkt, und es ist daher nicht zutreffend, wenn Hasselbalch (Neutralitätsregulation und Reizbarkeit des Atemzentrums in ihren Wirkungen auf die Kohlensäurespannung des Blutes. Diese Zeitschr. **46**, 403, 1912) in seiner historischen Übersicht meint, daß wir aus den älteren Versuchen mit Injektion von Säuren in das Blut „schon ungefähr ebensoviel" wußten.

T. Br. Robertson (Über die Wirkung von Säuren auf das Atemzentrum. Arch. f. d. ges. Physiol. **145**, 329, 1912) hat darauf aufmerksam gemacht, daß er bereits im Jahre 1908 Versuche über die Reizwirkung von Säuren auf das Atemzentrum des Frosches unter direkter Applikation der Säure auf das freigelegte Kopfmark mitgeteilt habe. Diese Versuche, die in Arbeiten enthalten sind, unter deren Titel sie niemand suchen kann, waren mir in der Tat entgangen. Wenn aber Robertson meint, daß die Methode des Auftropfens eine „direktere" sei und die Deutung der Resultate weniger zweifelhaft erscheinen lasse, so vermag ich diese Ansicht nicht zu teilen, vielmehr scheinen mir diese Versuche, die an Tieren mit intaktem Blutkreislauf angestellt sind, keinen wesentlichen Vorteil gegenüber der Infusion von Säuren in die Blutbahn zu bieten, da auch hier die Möglichkeit einer Mitwirkung der Blutkohlensäure nicht ausgeschlossen ist.

Es liegt mir durchaus fern, meinen Anteil an der Entwicklung der neuen Theorie der Atmungsregulation zu überschätzen, die, wie ich in meiner ersten Mitteilung hinlänglich klar dargelegt zu haben glaube, auf den Beobachtungen und Gedanken zahlreicher älterer Forscher aufgebaut ist. Wenn aber Hasselbalch (l. c.) schreibt, ich hätte als erster die Theorie ausgesprochen, die „ihres Inhaltes nach also schon längst aufgestellt" war, so scheint mir das doch ein wenig an die Geschichte von dem Ei des Kolumbus zu gemahnen.

[1]) O. Porges, A. Leimdörfer und E. Markovici, Über die Regulation der Atmung in pathologischen Zuständen. Wiener klin. Wochenschr. **23**, Nr. 40, 1910; Über die Kohlensäurespannung des Blutes in pathologischen Zuständen. Zeitschr. f. klin. Med. **73**, 389, 1910.

rungen aus zu der Vorstellung kamen, daß umgekehrt der Atmung die Aufgabe obliegt, die Reaktion des Blutes konstant zu erhalten. Diese beiden ihrem Wesen nach naturgemäß identischen, weil einander gegenseitig bedingenden Vorstellungen sollen im folgenden als „Reaktionstheorie" bezeichnet werden[1]).

Ehe ich die inzwischen erschienenen Arbeiten bespreche, die mit diesem Problem in engerem Zusammenhang stehen und, wie wir sehen werden, größtenteils eine glänzende Bestätigung der Reaktionstheorie ergeben haben, möchte ich kurz die Begriffe „Reiz" und „Erregbarkeit" in ihrer Anwendung auf die Funktion der Atemzentren zu analysieren versuchen, weil hier augenscheinlich vielfach eine große Unklarheit herrscht, die die Quelle immer neuer Mißverständnisse und gänzlich unfruchtbarer Auseinandersetzungen darstellt.

Wir wissen, daß die Tätigkeit der Atemzentren eine automatische ist[2]), d. h. daß die rhythmischen Impulse der Atemzentren durch die in ihnen selbst sich abspielenden Stoffwechselvorgänge bedingt und nicht an von außen kommende Einflüsse gebunden sind. Bezeichnet man daher als „Reiz" entsprechend der etwa bei den Reflexbewegungen üblichen Ausdrucksweise jene plötzlichen Änderungen der Umgebungsbedingungen, durch die eine bestimmte Reaktion ausgelöst wird, dann kann man, wenn man von der reflektorischen Regulierung durch die Vagi absieht, von „Atemreizen" unter gewöhnlichen Bedingungen überhaupt nicht sprechen, wie ja auch heute niemand mehr nach den normalen „Herzreizen" sucht, welche die automatische Tätigkeit des Herzens auslösen. Nun ist aber die normale Atmung selbstredend wie jeder Lebensvorgang an eine große Zahl von Bedingungen geknüpft, mit deren Änderung auch die Atmungstätigkeit sich ändert, bzw. völlig zum Stillstand kommt.

[1]) Hasselbalch (l. c.) hat den Namen „Neutralitätstheorie" gewählt, eine Bezeichnung, die mir wenig glücklich erscheint, denn das Wesentliche liegt ja nicht in der Erhaltung der (in Wirklichkeit gar nicht vorhandenen) neutralen, sondern in der einer bestimmten Reaktion, bzw. in dem regulatorischen Einfluß von Änderungen derselben.

[2]) Vgl. H. Winterstein, Die automatische Tätigkeit der Atemzentren. Arch. f. d. ges. Physiol. 138, 159, 1911. — C. Foà, Sulle cause del ritmo respiratorio. Mem. della R. Accad. delle scienze di Torino. Ser. 2, T. 62, p. 335, 1911.

Solche Bedingungen sind die normale Struktur der Atemzentren, ihre Ernährung, die Temperatur, die O_2-Versorgung, der CO_2-Druck usw. Es steht nun ganz im Belieben des Forschers, unter diesen zahlreichen Bedingungen die eine oder die andere herauszugreifen und — unter Konstantsetzung der übrigen — die Funktionalbeziehung zu untersuchen, die zwischen der Atmungstätigkeit und dieser willkürlich gewählten unabhängigen Variablen besteht. So können wir z. B. untersuchen, wie die Größe der Lungenventilation mit Änderung des CO_2-Druckes variiert; gehen wir dabei von jener Grenze aus, unterhalb deren die Atmungstätigkeit völlig zum Stillstand kommt (Apnoe), so können wir dann, wenn wir wollen, das Vorhandensein eines bestimmten CO_2-Druckes als den „Atemreiz" betrachten, der die Atmung „auslöst". Da nun die Lungenventilation aber nicht bloß von dem CO_2-Druck, sondern auch noch von anderen Faktoren, z. B. der Temperatur abhängt, so werden wir finden, daß bei verschiedener Temperatur bestimmten Änderungen des CO_2-Druckes nicht immer die gleichen Änderungen der Atemgröße entsprechen, oder, in der üblichen physiologischen Ausdrucksweise, daß die „Erregbarkeit" oder „Reizbarkeit" der Atemzentren gegenüber diesem Atemreiz bei wechselnder Temperatur eine verschiedene ist. Gegen eine derartige Auffassungs- und Ausdrucksweise ist solange nichts einzuwenden, als man sich über das Willkürliche derselben im klaren ist. Denn offenbar könnte man mit genau demselben Recht z. B. die Temperatur als den „Atemreiz" betrachten und sagen, daß die „Erregbarkeit" der Atemzentren gegenüber diesem Reiz bei verschiedenem CO_2-Druck variiert. Nur Unklarheit über diese erkenntnistheoretischen Grundlagen der Forschung aber kann schuld daran sein, wenn immer noch die Frage nach den „wahren Atemreizen" erörtert und wenn bis in den neuesten Arbeiten von Haldane und Hasselbalch und deren Mitarbeitern allen Ernstes diskutiert wird, ob die bei O-Mangel auftretenden Erstickungsstoffe selbst Atemreize sind oder bloß die Erregbarkeit der Atemzentren verändern, Scheinprobleme, die ein jeder vermeiden wird, der sich von einem mystischen Ursachenbegriff frei gemacht hat und mit Ernst Mach die Aufgabe der Forschung lediglich darin sucht, die Funktionalbeziehungen zwischen den einzelnen Erscheinungen zu ermitteln,

oder, wie dies Verworns „Konditionismus“ populärer, aber weniger präzise ausdrückt, die Bedingungen ihres Eintritts festzustellen.

Geht man von diesem Gesichtspunkte aus, so besteht das vorliegende Problem darin, zu entscheiden, ob CO_2-Druck und O_2-Druck (bzw. die bei O-Mangel oder auch bei sonstigen Oxydationsstörungen auftretenden Stoffwechselprodukte) ihre Wirkung auf die Atmung vermöge ihrer „spezifischen Natur“, d. h. ihrer besonderen chemischen Struktur, oder aber entsprechend der Reaktionstheorie lediglich vermöge der durch sie bedingten Änderung der $[H^{\cdot}]$ ausüben, die somit unter gewöhnlichen Bedingungen als der alleinige chemische Regulator der Atmung anzusehen wäre. Selbstverständliche Voraussetzung ist dabei, daß die übrigen Variablen, deren Funktion die Atmungstätigkeit noch ist, konstant gesetzt werden, d. h. daß die „Erregbarkeit“ der Atemzentren sonst unverändert bleibt. Es ist das Verdienst von Hasselbalch (l. c.), dieses letztere Moment mit Nachdruck hervorgehoben zu haben, das von anderen Autoren nicht genügend berücksichtigt wurde. Denn wenn auch unter gewöhnlichen Bedingungen die Erregbarkeit des Atemzentrums sehr konstant zu sein (d. h. also ihre Beeinflussung durch andere Faktoren als die $[H^{\cdot}]$ keine Rolle zu spielen) scheint und die abweichenden Ergebnisse von Hasselbalch und seinen Schülern der von verschiedenen Seiten an ihnen geübten Kritik[1]) anscheinend nicht standzuhalten vermögen, so ist doch nicht zu bezweifeln, daß unter abnormen Verhältnissen solche Veränderungen auftreten, oder wenigstens auftreten können, so daß diese Möglichkeit stets eine Mitberücksichtigung erfordert.

So hat Herlitzka[2]) gegen meine Versuche den naheliegenden Einwand erhoben, daß die $[H^{\cdot}]$ der von mir verwendeten karbonatfreien Ringer-Lösung, bei deren Durchspülung dauernd Apnoe bestand, größer war als die des Blutes, das normalerweise die Atmung erhält; er hat aber selbst darauf hinweisen müssen, daß unter den gegebenen Versuchsbedin-

[1]) Vgl. C. G. Douglas, Die Regulation der Atmung beim Menschen. Ergebn. d. Physiol. **14**, 338, 1914.

[2]) A. Herlitzka, Sui liquidi atti a conservare la funzione dei tessuti sopraviventi. Nota VI. Arch. di Fisiol. **10**, 261, 1912.

gungen möglicherweise die Erregbarkeit der Atemzentren eine geringere sein kann (in Wahrheit schon wegen der niedrigen Temperatur sein muß!), womit doch diesem Einwand jeder Boden entzogen ist. Und genau so wenig beweist es natürlich etwas gegen die Reaktionstheorie, wenn Herlitzka in seinen Versuchen an Winterschläfern bei Zusatz von Urethan in geringer Konzentration, wodurch nach seinen eigenen Angaben die Lebensdauer der künstlich durchspülten Tiere verlängert (also vermutlich auch die Erregbarkeit der Nervenzentren gesteigert) wurde, Atembewegungen bereits bei Durchspülung mit neutraler Ringer-Lösung ohne CO_2-Zusatz auftreten sah.

Schon in meiner ersten Mitteilung habe ich darauf hingewiesen, daß der ideale Beweis für die Richtigkeit der Reaktionstheorie, der in der dauernden Erhaltung der Atmung bei künstlicher Durchspülung mit anderen Säuren von bestimmter (soll heißen isohydrischer) Konzentration bestände, aus naheliegenden Gründen nicht zu führen ist. In der Tat haben auch zahlreiche weitere, nicht veröffentlichte Versuche mich gelehrt, daß es nicht möglich ist, eine Säure zu finden, deren Zusatz die Überlebensdauer der neugeborenen Tiere nicht mehr oder weniger beeinträchtigen, also die Lebensfähigkeit der Nervenzentren nicht schädigen würde. Der Versuch mit dieser Methodik, verschiedenartige Säuren auf ihre isohydrische Wirksamkeit zu prüfen, mußte also von vornherein aussichtslos erscheinen. Trotzdem ist er von Laqueur und Verzár[1]) unternommen worden, und die Ergebnisse dieser Versuche, die, wie leicht vorauszusehen war, mit der Reaktionstheorie in Widerspruch stehen mußten, wurden von den Autoren für Beweise gegen die Richtigkeit derselben und für eine spezifische Wirkung der Kohlensäure auf die Atemzentren gehalten. Da aber die Autoren selbst Gelegenheit hatten sich davon zu überzeugen, daß auch den Anionen, bzw. den undissoziierten Molekülen eine Bedeutung zukommt, so beweist die Beobachtung, daß die meisten Säuren (eben wegen ihrer schädigenden, daher auch die Erregbarkeit beeinträchtigenden Wirkung) erst bei viel höherer [H˙], Acetatgemische u. a. wieder wegen ihrer „spezifischen“ Wirkung

[1]) E. Laqueur und F. Verzár, Über die spezifische Wirkung der Kohlensäure auf das Atemzentrum. Arch. f. d. ges. Physiol. **143**, 395, 1912.

schon bei geringerer [H˙] als die Kohlensäure Atmungen auslösen, in Wirklichkeit gar nichts. Von zahlreichen, von mir selbst in gleicher Richtung angestellten und in ihrer Gesamtheit ebenfalls ergebnislosen Versuchen möchte ich nur hervorheben, daß ich bei Durchspülung unter Zusatz von Lactatgemischen als Regulatoren der [H˙], die nachweislich keine „spezifisch" erregende und keine sehr stark schädigende Wirkung ausüben, die Atmung bei einer [H˙] auftreten sah, die mit jener der wirksamen CO_2-Konzentration sehr gut übereinstimmte. Immerhin war auf diesem Wege eine Entscheidung nicht möglich.

Bekanntlich hatten die Untersuchungen von Zuntz, Haldane und deren Mitarbeitern (vgl. meine erste Mitteilung sowie Douglas, l. c.) ergeben, daß für gewöhnlich der CO_2-Druck der Alveolarluft (und mithin des Blutes) als alleiniger chemischer Regulator der Atmung betrachtet werden könne. Aber für alle Bedingungen des O-Mangels traf dies nicht mehr zu; hier konnten, besonders bei starker Muskelarbeit und im Hochgebirge, die Lungenventilation und die CO_2-Spannung der Alveolarluft Änderungen in entgegengesetztem Sinne erfahren, die CO_2 also auf keinen Fall mehr das allein maßgebende Moment darstellen. Die ganz analoge Beobachtung der Herabsetzung der alveolaren CO_2-Tension bei kardialer und anderen pathologischen Dyspnoeformen, und die anscheinende „Zwecklosigkeit" dieser „O-Mangel-Dyspnoe" bei normalem O-Druck der Alveolarluft waren es, die Porges und seine Mitarbeiter (l. c.) zu der Vorstellung führten, daß die Aufgabe der Hyperpnoe hier in erster Linie darin bestehe, die durch den Übertritt von sauren Produkten unvollkommener Oxydation (die im folgenden einfach als „Erstickungsstoffe" bezeichnet werden sollen) bedingte Steigerung der [H˙] des Blutes bei O-Mangel wieder auf die Norm zurückzuführen, was natürlich zur Voraussetzung hat, daß nicht der CO_2-Druck, sondern eben die [H˙] das Ausmaß der Lungenventilation reguliert. Ganz in Übereinstimmung mit dieser Theorie beobachteten Porges und seine Mitarbeiter, daß während der Magenverdauung, bei der durch die Salzsäuresekretion, wie längst bekannt, die „Titrationsalkalinität" des Blutes ansteigt, und die „Acidität" des Harns sinkt, die alveolare CO_2-Tension vermehrt ist. Andererseits ergab die

Untersuchung in vielen Fällen von Diabetes, bei dem bekanntlich häufig saure Stoffwechselprodukte im Blute auftreten, eine hochgradige Herabsetzung der alveolaren CO_2-Spannung; fleischreiche Kost sowie Entziehung von Kohlenhydraten verminderten, Zufuhr von Soda erhöhten dieselbe.

Auf Grund dieser Beobachtungen glaubten Porges und seine Mitarbeiter sich zu der Schlußfolgerung berechtigt, daß eine Herabsetznng der CO_2-Spannung in der Alveolarluft ohne weiteres als Zeichen und Maß einer „Acidosis", d. h. einer Vermehrung der fixen Säuren im Blute verwendbar sei, und folgerten unter anderem, daß auch in der Schwangerschaft ein derartiger Zustand vorliege, da auch hier in einem großen Prozentsatz eine Herabsetzung der alveolaren CO_2-Spannung nachweisbar ist[1]). Eine derartige Verallgemeinerung ist aber, wie Hasselbalch (l. c.) mit Recht hervorhebt, unberechtigt, weil hierbei die Erregbarkeit der Atemzentren nicht berücksichtigt ist, deren Steigerung offenbar zu einer Herabsetzung der alveolaren CO_2-Spannung führen muß, ohne daß der Gehalt des Blutes an fixen Säuren sich zu ändern braucht. In der Tat sieht Hasselbalch in seiner ersten Mitteilung[2]) hierüber in einer solchen Steigerung der Erregbarkeit des Atemzentrums einen wesentlichen Faktor für das Zustandekommen der auch von ihm beobachteten Verminderung der alveolaren CO_2-Tension in der Gravidität; und wenn auch Porges[3]) gegen die von Hasselbalch verwendete Lindhardsche Methode der Erregbarkeitsprüfung des Atemzentrums gewichtige Bedenken vorgebracht hat, so bleibt doch die prinzipielle Berechtigung des Einwands unter allen Umständen bestehen.

Die Reaktionstheorie gestattet nun offenbar eine Entscheidung dieser Frage durch die direkte Bestimmung der $[H^{\cdot}]$ des Blutes. Ist die Erregbarkeit der Atemzentren eine normale, dann muß auch bei Herabsetzung der alveolaren CO_2-Spannung die $[H^{\cdot}]$ annähernd normal oder etwas erhöht

[1]) Leimdörfer, Novak und Porges, Über die Kohlensäurespannung des Blutes in der Gravidität. Zeitschr. f. klin. Med. 75, 301, 1912.

[2]) K. A. Hasselbalch, Ein Beitrag zur Respirationsphysiologie der Gravidität. Skandin. Arch. f. Physiol. 27, 1, 1912.

[3]) O. Porges, Über die Beziehungen der Kohlensäurespannung des Blutes zur Lungenventilation. Diese Zeitschr. 54, 182, 1913.

sein[1]), eine Steigerung der Erregbarkeit dagegen muß zu einer Verminderung der [H˙] führen, da diese dann auf ein tieferes Niveau eingestellt wird. Die Herabsetzung der CO_2-Spannung kann also, wie bereits Michaelis[2]) treffend ausgeführt hat, nur dann als Zeichen und Maß einer Acidosis verwendet werden, wenn die [H˙] normal (oder gesteigert), nicht aber wenn sie herabgesetzt ist. Tatsächlich haben nun die Untersuchungen von Benedict[3]) bei Diabetes und von Rolly[4]) bei Diabetes und bei Urämie eine normale oder gesteigerte [H˙] ergeben, so daß die Herabsetzung der CO_2-Tension der Alveolarluft hier in der Tat das Bestehen einer Acidosis beweist, wie dies von Porges und seinen Mitarbeitern und ebenso von Straub[5]) und Schlayer angenommen wurde. Bezüglich der Schwangerschaft scheinen die Verhältnisse noch nicht genügend geklärt. Während zahlreiche von Michaelis (l. c.) ausgeführte Bestimmungen der [H˙] im Blute von Schwangeren als Mittel einen um etwa 10% niedrigeren Wert ergaben als in der Norm, so daß tatsächlich entsprechend der früher erwähnten Annahme von Hasselbalch eine Steigerung der Erregbarkeit der Atemzentren vorzuliegen scheint, beobachtete Hasselbalch[6]) kürzlich in gemeinsam mit Gammeltoft aus-

---

[1]) In Wirklichkeit muß in solchen Fällen stets eine Steigerung der [H˙] über die Norm vorhanden sein, da ja sonst die die Herabsetzung der CO_2-Tension herbeiführende Verstärkung der Lungenventilation nicht zustande kommen könnte. Diese Steigerung kann jedoch, wie noch zu erörtern sein wird, infolge der außerordentlichen Empfindlichkeit der Atemzentren gegen Änderungen der [H˙] so gering sein, daß sie in das Bereich der individuellen Schwankungen hineinfällt und so im Einzelfall sich dem Nachweis entzieht.

[2]) L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration. Springer, Berlin 1914, S. 97 f.

[3]) H. Benedict, Der Hydroxylionen-Gehalt des Diabetikerblutes. Arch. f. d. ges. Physiol. **115**, 106, 1906.

[4]) F. Rolly, Untersuchungen über den Grad der Blutalkalescenz bei Gesunden und Kranken. Deutsch. Zeitschr. f. Nervenheilkunde **47/48**, 617, 1913.

[5]) H. Straub, Acidosebestimmungen bei Diabetes mellitus. Deutsch. Arch. f. klin. Med. **109**, 233, 1913. — Straub und Schlayer, Die Urämie eine Säurevergiftung? Münch. med. Wochenschr. **59**, 569, 1912.

[6]) K. A. Hasselbalch und S. A. Gammeltoft, Die Neutralitätsregulation des graviden Organismus. Diese Zeitschr. **68**, 206, 1915.

geführten Untersuchungen dennoch (also in Bestätigung der früher bekämpften Auffassung von Porges) das Vorhandensein einer Acidose, nämlich einer Steigerung der „fixierten Acidität“, die in einer Erhöhung der [H˙] bei konstantem CO_2-Druck gegenüber der Norm zum Ausdruck kam, aber durch die Verminderung der CO_2-Spannung völlig kompensiert wurde, so daß die Reaktion des Blutes ([H˙] bei dem wirklich vorhandenen alveolaren CO_2-Druck) normal blieb. Es wäre schließlich nicht undenkbar, daß beide Momente gleichzeitig zusammenwirken können, so daß eine Steigerung der Erregbarkeit der Atemzentren trotz bestehender leichter Acidose diese zu überkompensieren und so die aktuelle Reaktion des Blutes noch unter die Norm herabzusetzen vermöchte[1]).

---

[1]) Während somit die Herabsetzung der CO_2-Tension der Alveolarluft nur in bedingtem Maße als Zeichen von Acidosis verwertbar ist, gilt dies natürlich nicht für das von Morawitz und Walker (Über ein tonometrisches Verfahren zur Bestimmung des Gleichgewichts zwischen Säuren und Basen im Organismus. Diese Zeitschr. **60**, 395, 1914) empfohlene Verfahren, bei welchem das CO_2-Bindungsvermögen des Blutes durch Schütteln mit einer Atmosphäre von bekanntem CO_2-Gehalt direkt bestimmt wird. Es muß aber nachdrücklich hervorgehoben werden, daß hierbei unter der durch vermindertes CO_2-Bindungsvermögen des Blutes charakterisierten „Acidosis“, im Sinne von Porges eine Steigerung des Gehaltes an fixen Säuren zu verstehen ist, und nicht etwa „Acidität“ oder tatsächlich saure Reaktion des Blutes, die, wie auch aus den Untersuchungen von Rolly (l. c.) hervorgeht, wohl nur in den letzten Stadien schwerster Säurevergiftung zu beobachten sein dürfte. Die Verwechslung dieser beiden Begriffe ist in klinischen Arbeiten nicht selten feststellbar. — Das gleiche gilt in noch höherem Maße für die beiden Begriffe der (aktuellen) alkalischen Reaktion und der „Alkalescenz“ oder Titrationsalkalinität. Es wäre sehr an der Zeit, den letzteren, zu ständigen Verwechslungen führenden Ausdruck in der Biologie (und auch Hydrologie) gänzlich auszuschalten und durch die klare Bezeichnung „Säurebindungsvermögen“ zu ersetzen. Als Beispiele, zu welchen Mißverständnissen die hier vielfach herrschende Unklarheit selbst bei Autoren führt, die sich mit diesen Fragen näher beschäftigt haben, seien die Arbeiten von Rolly und von Morawitz und Walker angeführt. Der erstere polemisiert gegen die Methoden, welche die CO_2-Spannung als Maß der „Blutalkalescenz“ verwenden und stellt die Methode der direkten Bestimmung der [H˙] als die allein exakte hin, die letzteren halten wieder die von ihnen empfohlene Methode für die geeignetere, weil sie „feinere Ausschläge als die physikalisch-chemische“ gebe, und führen als Beweis dafür an, daß die CO_2-Methoden bei Urämie

Ganz analoge Betrachtungen, wie sie für die Herabsetzung der alveolaren CO_2-Tension in pathologischen Zuständen gelten, lassen sich nun auch für die gleiche im Hochgebirge zu beobachtende Erscheinung anstellen und scheinen nunmehr auch Haldane und seine Mitarbeiter[1]) dazu veranlaßt zu haben, sich auf den Standpunkt der Reaktionstheorie zu stellen und nicht mehr den CO_2-Druck, sondern die [H˙] als den wahren Regulator der Atmung zu betrachten. Barcroft[2]) hatte nämlich beobachtet, daß das Blut zweier Versuchspersonen, das bei gleichem CO_2-Druck ungefähr die gleiche Dissoziationskurve aufwies, dies auch im Hochgebirge tat, obwohl hier der CO_2-Druck bei der einen Versuchsperson herabgesetzt war. Da er nun in früheren Untersuchungen festgestellt hatte, daß auch andere Säuren den gleichen Einfluß wie die Kohlensäure auf die Dissoziationskurve ausüben, so folgerte er, daß die Verminderung der CO_2-Spannung bei dieser Versuchsperson durch andere Säureradikale gerade soweit kompensiert wurde, daß die Dissoziationskurve (d. h. also wohl auch die [H˙]) unverändert blieb. Die Steigerung der [H˙], die in Wahrheit vor-

---

und diabetischer Acidose „in seltener Übereinstimmung eine Herabsetzung der Alkalescenz erkennen lassen", während Rolly in seinen Untersuchungen eine solche häufig vermißte. Keiner von diesen Autoren hat sich mithin richtig klar gemacht, daß die beiden Methoden ganz verschiedene Dinge messen, die eine die aktuelle Reaktion, die andere das Säurebindungsvermögen, und daß die mangelnde Übereinstimmung der Resultate nicht auf Ungenauigkeit beruht, sondern geradezu ein theoretisches Postulat und einen der besten Beweise für die Richtigkeit der Reaktionstheorie darstellt, indem bei Verminderung des Säurebindungsvermögens die [H˙] durch eine entsprechende Herabsetzung der CO_2-Tension fast konstant erhalten wird. — Um die [H˙] des Blutes entsprechend dem tonometrischen Verfahren von Morawitz als Maß des Säurebindungsvermögens und so der etwa vorhandenen Acidose verwenden zu können, darf man sie nicht bei dem tatsächlich im Blute vorhandenen (alveolaren) CO_2-Druck messen, sondern muß dies bei dem CO_2-Druck eines zum Vergleich dienenden normalen Blutes tun, wie dies Hasselbalch verschiedentlich durchgeführt hat. Unter diesen Bedingungen dürften sich beide Methoden als annähernd gleich empfindlich erweisen.

[1]) Campbell, Douglas, Haldane and Hobson, The response of the respiratory centre to carbonic acid, oxygen and hydrogen ion concentration. Journ. of Physiol. 46, 301, 1913.

[2]) J. Barcroft, The effect of altitude on the dissociation curve of blood. Journ. of Physiol. 42, 44, 1911.

handen sein mußte, um die beobachtete Steigerung der Lungenventilation um etwa 50 % (und die dadurch bedingte Verminderung der alveolaren CO_2-Tension) zu erklären, konnte, wie Haldane (l. c.) meint, zu gering sein, um in einer Änderung der Dissoziationskurve zum Ausdruck zu kommen. Doch fand Barcroft[1]) später in der Tat doch eine leichte Abweichung der Dissoziationskurve, wie sie einer Steigerung des CO_2-Drucks um etwa 2 mm entsprechen würde und zur Erklärung der tatsächlich beobachteten Ventilationssteigerung ausreicht.

Handelt es sich in den bisher erörterten Fällen immer um mehr indirekte Beobachtungen, die allerdings sehr überzeugend zugunsten der Reaktionstheorie sprechen, weil sie nicht bloß mit ihr in völliger Übereinstimmung stehen, sondern von einem anderen Standpunkte aus unverständlich wären, so haben schließlich die schönen Untersuchungen Hasselbalchs[2]) die Regulierung der [H˙] des Blutes durch die Atmung auf das klarste direkt erwiesen. Hasselbalch fand, daß durch bloße Diätänderungen die [H˙] des Harns sich beim normalen Menschen innerhalb so weiter Grenzen variieren läßt, daß alle unter pathologischen Bedingungen beobachteten Werte in die Grenzen dieser Änderungen hineinfallen. Hierbei ändert sich nun (bei konstanter Erregbarkeit des Atemzentrums) die alveolare CO_2-Spannung in umgekehrter Richtung, woraus hervorgeht, daß die CO_2 lediglich als Säure wirkt und die Atmung die Aufgabe hat, die [H˙] des Blutes konstant zu erhalten. Während nämlich die [H˙] des Blutes, auf gleiche CO_2-Spannung bezogen, bei Fleischdiät anwächst, wird durch die Atmung die CO_2-Spannung so weit herabgesetzt, daß die [H˙] in Wirklichkeit fast konstant bleibt. So war in einem Versuche die [H˙] des Blutes auf den gleichen CO_2-Druck bezogen: bei Fleischdiät $10^{-7,33}$, bei vegetarischer Diät $10^{-7,42}$; durch die Verminderung der CO_2-Spannung im ersteren Falle aber wurde bewirkt, daß der tatsächlich im Blute vorhandene Unterschied nur $10^{-7,34}$ gegen $10^{-7,36}$ betrug, also äußerst gering war. Eine leichte Steigerung

1) J. Barcroft, The effect of altitude on mesectic curves of individuals. Journ. of Physiol. **46**, III, 1913.

2) K. A. Hasselbalch, Neutralitätsregulation und Reizbarkeit des Atemzentrums in ihren Wirkungen auf die Kohlensäurespannung des Blutes. Diese Zeitschr. **46**, 403, 1912.

der [H˙] muß natürlich, wie schon mehrfach erwähnt, vorhanden sein, da ja sonst die Lungenventilation nicht die zur Herabsetzung der CO_2-Spannung erforderliche Verstärkung erfahren würde.

Erscheint somit der Nachweis, daß die Atmung der Konstanterhaltung der [H˙] dient, in völlig befriedigender Weise geführt, so fehlt es doch noch an direkten Beweisen dafür, daß umgekehrt die Änderungen in der Stärke der Lungendurchlüftung (Dyspnoe usw.) auf Änderungen der [H˙] und nicht solcher der CO_2-Spannung oder sonstigen „spezifischen" Einflüssen beruhen.

Daß die hier in Betracht kommenden Änderungen der [H˙] des Blutes meßbare Größen darstellen, ergibt sich wieder aus Untersuchungen von Hasselbalch und Lundsgaard. Diese zeigten zuerst in Versuchen in vitro[1]), daß die [H˙] des Blutes bei künstlicher Steigerung der CO_2-Spannung um 20 mm Hg, wie sie etwa dem Unterschiede zwischen arteriellem und venösem Blute entspricht, eine Erhöhung um etwa $0{,}13 \times 10^{-7}$ erfährt, und konnten dann auch am lebenden Tier[2]) durch Ventilation der Lunge mit Luft von verschiedenem CO_2-Gehalt gleichsinnige Änderungen der [H˙] des Blutes nachweisen. — Eben wegen dieser Gleichsinnigkeit aber konnten die Versuche keinen entscheidenden Aufschluß darüber geben, ob die bei CO_2-Atmung auftretende Verstärkung der Lungenventilation (CO_2-Dyspnoe) durch die Steigerung des CO_2-Drucks oder jene der [H˙] bedingt wird, obwohl auch hier bereits ein Teil der Versuche deutlich zugunsten der letzteren Auffassung sprach. Während nämlich in sechs Versuchen der Parallelismus zwischen den Änderungen der CO_2-Spannung und jenen der [H˙] ein so weitgehender war, daß sowohl die letztere wie die erstere als „chemischer Reiz" des Atemzentrums angesehen werden konnte, ergab sich in einem Versuche bei Einatmung einer Luftmischung von 1,05% CO_2-Gehalt eine starke Steigerung der Lungenventilation und der [H˙] bei ziemlich unveränderter CO_2-Spannung der Alveolarluft, und bei Einatmung von 2,26% CO_2

---

[1]) Hasselbalch und Lundsgaard, Elektrometrische Reaktionsbestimmung des Blutes bei Körpertemperatur. Diese Zeitschr. 38, 77, 1912.

[2]) Hasselbalch und Lundsgaard, Blutreaktion und Lungenventilation, Skandin. Arch. f. Physiol. 27, 13, 1912.

enthaltender Luft umgekehrt Erhöhung der alveolaren CO_2-Spannung, dagegen ungefähre Konstanz der Lungenventilation und der [H˙], und auch bei einem weiteren Versuche stimmten die Änderungen der Lungenventilation mit jenen der [H˙] besser überein als mit jenen der CO_2-Spannung. Gegen die Beweiskraft dieser Versuche läßt sich allerdings einwenden, daß in diesen Fällen die Änderungen der [H˙] vielleicht überhaupt nicht durch die CO_2-Einatmung, sondern durch die in den meisten Versuchen beobachtete „spontane" Säuerung des Blutes bedingt waren, oder daß die mit mancherlei Fehlerquellen behaftete und nicht ganz gleichzeitig vorgenommene Bestimmung der alveolaren CO_2-Spannung keinen richtigen Aufschluß über die CO_2-Spannung des Blutes, zum mindesten des zu dem betreffenden Zeitpunkt die Atemzentren umspülenden Blutes gegeben habe; denn es wäre sonst nicht recht verständlich, wieso bei im übrigen unveränderter Erregbarkeit des Atemzentrums derartige Divergenzen in den Änderungen der CO_2-Spannung und jenen der [H˙] auftreten konnten, da die letzteren doch durch die ersteren hervorgerufen sein sollten. — Auf jeden Fall aber zeigen die Versuche von Hasselbalch und Lundsgaard, die ich noch durch einige eigene Versuche ergänzt habe, in denen die CO_2-Dyspnoe nicht durch künstliche Beimengung von CO_2 zur Atemluft, sondern sozusagen von innen heraus durch allmähliche Ansammlung der CO_2 bei Atmung eines abgeschlossenen Luftquantums (von konstant erhaltenem O_2-Gehalt) erzeugt wurde, daß die Änderungen der [H˙] mindestens ebensogut für das Auftreten der CO_2-Dyspnoe verantwortlich gemacht werden können wie jene in der Spannung der Kohlensäure, so daß für die Annahme einer „spezifischen" Wirkung der letzteren keinerlei Anlaß vorliegt.

Ein Gegenstück zu diesen Versuchen geben solche von Milroy[1]), der umgekehrt den Einfluß der durch lebhafte Ventilation hervorgerufenen Verminderung des CO_2-Drucks auf die [H˙] untersuchte und einen raschen Abfall derselben bei Eintritt der Apnoe und eine Rückkehr zur Norm nach Aufhören derselben beobachtete. Künstliche Atmung mit CO_2-reichen Gas-

[1]) T. H. Milroy, Changes in the hydrogen ion concentration of the blood produced by pulmonary ventilation. Quart. Journ. of Physiol. 8, 141 (zit. nach Centralbl. f. Physiol. 29, 214, 1914).

gemischen rief Ansteigen der [H˙] ohne Apnoe hervor. Der Verfasser schließt auf einen Zusammenhang zwischen [H˙] und Tätigkeit des Atemzentrums, der aber natürlich auch durch diese Versuche nicht streng bewiesen wird, da die Änderungen der [H˙] ja auch hier von gleichsinnigen Änderungen des CO_2-Drucks begleitet gewesen sein mußten.

Da die Gleichsinnigkeit der bei der CO_2-Dyspnoe auftretenden Änderungen des CO_2-Drucks und der [H˙] eine Entscheidung der Frage nach dem hier wirksamen Faktor nicht ermöglicht, so lag der Gedanke nahe, Versuche mit Infusion anderer Säuren anzustellen und zu untersuchen, wie sich hierbei die gleichzeitig erfolgenden Änderungen des CO_2-Drucks, der [H˙] und der Lungenventilation zueinander verhalten. Handelte es sich um eine spezifische Wirkung der Kohlensäure, und war die von zahlreichen Autoren beobachtete Steigerung der Lungenventilation bei Säurevergiftung auf eine durch Herabsetzung des Säurebindungsvermögens des Blutes erzeugte Steigerung der CO_2-Tension zurückzuführen, so mußten die drei genannten Größen eine gleichsinnige Änderung erfahren und die Steigerung der Atemgröße jener des CO_2-Drucks parallel gehen; war hingegen die [H˙] der maßgebende Faktor, so mußte der Parallelismus zwischen dieser und der Lungendurchlüftung bestehen, während der CO_2-Druck sich nicht in gleichem Maße zu ändern brauchte, ja, in Anbetracht des Umstandes, daß es sich um stärkere Säuren handelte, vielleicht sogar gegensinnige Änderungen erfahren konnte. Eine der Säureinfusion entgegengesetzte Wirkung mußte die Infusion von Lauge ausüben.

Nach Abschluß meiner Versuche habe ich in der zuletzt besprochenen Arbeit von Hasselbalch und Lundsgaard (l. c. S. 28) die Angabe gefunden, daß auch sie bereits, vermutlich von analogen Erwägungen ausgehend, in einigen Versuchen durch Säureinjektion die [H˙] des Blutes künstlich erhöhten und dabei in der Tat unter Erniedrigung der alveolaren CO_2-Spannung die Ventilation bedeutend ansteigen sahen. Sie meinen jedoch, daß diese Versuche wegen der gleichzeitigen Einführung heterogener Reize schwer zu deuten seien, und scheinen aus diesem Grunde von einer weiteren Verfolgung derselben abgesehen zu haben. Wenn jedoch die Säureinfusionen

in einer solchen Weise erfolgen, daß die Änderungen der Atmungstätigkeit die einzige wahrnehmbare Reaktion darstellen, und wenn sich überdies zeigen läßt, daß ganz verschiedene Säuren völlig übereinstimmende Wirkungen hervorrufen, dann scheint mir keinerlei Schwierigkeit in der Deutung der letzteren vorzuliegen, da sie mit zwingender Notwendigkeit auf die allen Versuchen gemeinsamen Faktoren bezogen werden müssen, nämlich die Änderung der [H˙] oder jene der CO_2-Spannung.

2. Methodik.

Die Versuche erforderten die Messung der Lungenventilation, der [H˙] und der CO_2-Spannung des Blutes.

a) Messung der Lungenventilation. Als Versuchstiere dienten Kaninchen, die zur möglichsten Ausschaltung aller reflektorischen Einflüsse mit Chloralhydrat tief narkotisiert waren. Das Tier atmete durch eine Trachealkanüle mit kurzem Verbindungsstück aus einer ca. 11 l fassenden Atemflasche, die zur Absorption der Kohlensäure etwa 300 ccm 40 bis 50% KOH enthielt. Diese Absorption erfolgte allerdings nicht so schnell, daß es möglich gewesen wäre, den CO_2-Druck der Einatmungsluft auf Null zu halten. Er stieg vielmehr allmählich etwas an und konnte bei länger dauernden Versuchen zum Schluß 0,2 bis 0,3% betragen; dieser Übelstand bewirkte, daß während der Versuche allmählich von selbst eine Zunahme der Lungenventilation, des CO_2-Drucks und der [H˙] eintrat, die bei den Versuchsergebnissen in einzelnen Fällen, die noch hervorgehoben werden sollen, Berücksichtigung erfordert. Der verbrauchte Sauerstoff strömte durch ein Wasserventil unter konstantem Druck nach.

Die Atemflasche war mit einer Mareyschen Registrierkapsel verbunden, durch welche die Druckschwankungen der Atmung aufgezeichnet wurden. Die diesen entsprechenden Volumina wurden jedesmal nach Abschluß des Versuchs durch Auskalibrieren bestimmt. Dieses erfolgte in der Weise, daß der Schreibhebel von der Nullstellung aus zunächst durch Ansaugen in Inspirationsstellung gebracht und dann in einen mit der Atemflasche verbundenen Meßzylinder so viel Wasser eingepreßt wurde, bis der Hebel in Exspirationsstellung übergegangen war. Aus einigen derartigen Messungen wurde die mittlere (in einigen be-

sonders angeführten Fällen die minimale, bzw. maximale) Atemtiefe und durch Multiplikation mit der Atemfrequenz die gesamte Lungenventilation berechnet.

b) Messung der [H˙]. Die Messung der [H˙] erfolgte in Blutproben, die vor, während und nach der Infusion der Säurebzw. Laugenlösung durch eine in die Carotis eingebundene Kanüle mittels einer 10 ccm fassenden Spritze entnommen wurden, in die vorher 1 ccm ca. 3 mg Hirudin enthaltende physiologische Kochsalzlösung und — zur Bestimmung der CO_2-Tension (s. u.) — etwa 1 ccm Luft eingefüllt worden war. Die Messung der [H˙] wurde gleich nach Beendigung des Versuchs elektrometrisch mit der Apparatur und genau nach den Vorschriften von Michaelis vorgenommen, die er in der zitierten Monographie auf das genaueste dargelegt hat. Es wurden stets Doppelbestimmungen ausgeführt, die meist nur wenige Zehntel Millivolt untereinander differierten.

c) Messung der CO_2-Tension. Die CO_2-Tension wurde nicht in der Alveolarluft, sondern direkt im Blute bestimmt. Es schien mir dies die einzige Möglichkeit, mit völliger Sicherheit bei so kurz dauernden Versuchen Aufschluß über die CO_2-Spannung des tatsächlich zu den Atemzentren strömenden Blutes zu erhalten. Da es hierbei aber gar nicht darauf ankam, die CO_2-Spannung ihrem absoluten Werte nach ganz genau zu ermitteln, sondern nur unter den verschiedenen Versuchsbedingungen genau miteinander vergleichbare Werte zu erhalten, so wurde ein sehr einfaches Verfahren eingeschlagen. In die zur Blutentnahme dienende Spritze wurde vorher etwa 1 ccm Luft eingefüllt und durch längeres Hin- und Herschwenken und Liegenlassen der Druckausgleich zwischen ihr und dem Blute hergestellt. Die Luft wurde sodann über Quecksilber aufgefangen und in einen Pettersonschen Analysenapparat mit capillarer Meßbürette überführt und auf ihren CO_2-Gehalt untersucht. Bei der Kleinheit der Luftmenge (die gewählt wurde, um keinen zu großen CO_2-Verlust bei der Tensionsbestimmung herbeizuführen) konnte die Analyse nur auf etwa 0,2 bis 0,3 % genau durchgeführt werden, was sich jedoch für den vorliegenden Zweck als ausreichend erwies. Die so ermittelten Daten geben also nicht die absoluten Werte der CO_2-Tension des strömenden Blutes, da sie nicht bei Körpertemperatur gemessen

und daher auch von einer Berechnung der Dampfspannung Abstand genommen wurde, sind aber, da alle Bestimmungen eines Versuchs unter den gleichen Bedingungen des Druckes und der Temperatur ausgeführt wurden, untereinander genau vergleichbar.

Die Infusionsversuche wurden in der Weise angestellt, daß von den zu prüfenden, auf Körpertemperatur erwärmten Lösungen im ganzen etwa 10 bis 15 ccm innerhalb 1 bis 2 Minuten durch die Vena jugularis injiziert wurden. Wenn die hierdurch hervorgerufene Änderung der Atmung beiläufig ihren Höhepunkt erreicht hatte, wurde die Blutprobe entnommen und dann die Infusion abgestellt. Zu den Versuchen dienten Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Milchsäure, Kohlensäure und Natronlauge, $^n/_{10}$ bis $^n/_{20}$ in physiologischer Kochsalzlösung.

Die Versuchsergebnisse sind in Form von Tabellen wiedergegeben. Zur besseren Veranschaulichung des Verhaltens der drei untersuchten Größen ist an jede Tabelle ein Diagramm angeschlossen, in dem die gleichzeitigen Änderungen des Atemvolumens, der [H˙] und des CO_2-Drucks graphisch dargestellt sind. Die Maßstäbe sind willkürlich gewählt, aber in sämtlichen Versuchen gleichmäßig festgehalten, mit der einzigen Ausnahme, daß in den Versuchen 2, 6 und 7 den Änderungen der [H˙] wegen ihrer beträchtlichen Größe aus technischen Gründen ein kleinerer Maßstab ($0{,}5 \cdot 10^{-8}$ statt $0{,}2 \cdot 10^{-8}$) zugrunde gelegt ist.

3. Versuchsergebnisse.

Versuch 1.

24. XI. 14. Infusion von $^n/_{15}$-Salzsäure.

Zeit	Atemtiefe ccm	Minutenfrequenz	Minutenvolumen ccm	CO_2-Tension %	p_H	[H˙]
Vor Infusion 10ʰ47′	14,3	54	772	2,80	7,136	$7{,}31 \cdot 10^{-8}$
Während Inf. 10ʰ52′	18,5 (Maximum)	72	1332 (Maximum)	2,08	7,108	$7{,}80 \cdot 10^{-8}$
Nach Inf. 10ʰ56′	13,7	60	822	3,01	7,141	$7{,}23 \cdot 10^{-8}$

Die durch die Säureinjektion hervorgerufene Steigerung der Lungenventilation ging rasch vorüber; es sind daher für die Atemtiefe und das daraus berechnete Minutenvolumen die Maximalwerte angegeben; diese wurden nicht während der ganzen Dauer der Blutprobentnahme festgehalten.

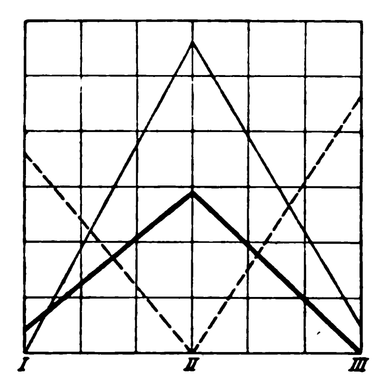


Fig. 1. Graphische Darstellung der gleichzeitigen Änderungen der Lungenventilation, der [H˙] und des CO_2-Drucks.
I vor, II während, III nach der Infusion.
—— Lungenventilation (1 Teilstrich = 100 ccm)
▬▬ [H˙] (1 „ = $0{,}2 \cdot 10^{-8}$)
------ CO_2-Tension (1 „ = 0,2 %)

Versuch 2.

25. XI. 14. Infusion von $^n/_{10}$-Natronlauge.

Zeit	Atemtiefe ccm	Minutenfrequenz	Minutenvolumen ccm	CO_2-Tension %	p_H	[H˙]
Vor Infusion 10ʰ54′	18	34	612	2,12	7,352	$4{,}45 \cdot 10^{-8}$
Während Inf. 10ʰ57′	12 (Minimum)	44 (Mittel)	528 (Minimum)	1,89	7,399	$3{,}99 \cdot 10^{-8}$
Nach Inf. 11ʰ04′	21	36	756	2,89	7,254	$5{,}57 \cdot 10^{-8}$

Auch hier war die durch die Injektion bedingte Änderung der Lungenventilation zu kurzdauernd, um während der ganzen Zeit der Blutprobeentnahme festgehalten zu werden; es sind die Minimalwerte für Atemtiefe und Minutenvolumen angegeben. Der Versuch ist außerdem durch das Auftreten der Reizerscheinungen kompliziert, die eine Unruhe des Tieres während der Infusion veranlaßten; auf sie ist aller Wahrscheinlichkeit nach die bedeutende Steigerung der Atemfrequenz zurückzuführen, durch die auch die Ventilationsgröße erhöht und der Wert des Versuchs beeinträchtigt wird.

Versuch 3.

27. XI. 14. Infusion von $^n/_{10}$-Phosphorsäure.

Zeit	Atemtiefe ccm	Minutenfrequenz	Minutenvolumen ccm	CO_2-Tension %	p_H	[H˙]
Vor Infusion 4ʰ49′	17	64	1088	3,06	7,389	$4{,}08 \cdot 10^{-8}$
Während Inf. 4ʰ57′	20	76	1520	2,45	7,343	$4{,}54 \cdot 10^{-8}$
Nach Inf. 5ʰ02′	18	74	1332	2,50	7,372	$4{,}25 \cdot 10^{-8}$

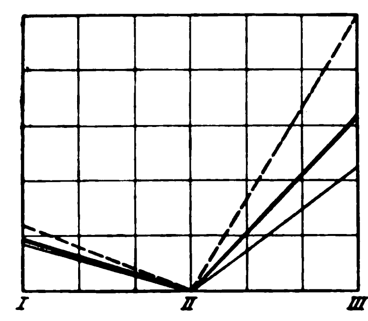


Fig. 2. Graphische Darstellung von Versuch 2 (entsprechend Fig. 1, nur ist für [H˙] 1 Teilstrich = $0,5 \cdot 10^{-8}$).

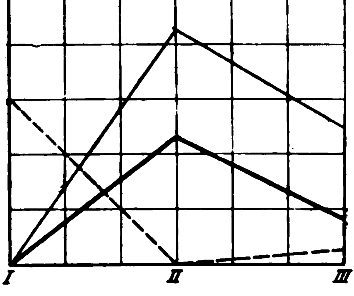


Fig. 3. Graphische Darstellung von Versuch 3 (entsprechend Fig. 1).

Versuch 4.

28. XI. 14. Infusion von $^{n}/_{10}$-Essigsäure.

Zeit	Atemtiefe ccm	Minutenfrequenz	Minutenvolumen ccm	CO_2-Tension %	p_H	[H˙]
Vor Infusion $10^h\,10'$	18	53	954	2,49	7,386	$4,11 \cdot 10^{-8}$
Während Inf. $10^h\,15'$	22	62	1364	2,02	7,318	$4,81 \cdot 10^{-8}$
Nach Inf. $10^h\,20'$	18	57	1026	2,04	7,408	$3,91 \cdot 10^{-8}$

Versuch 5.

1. XII. 14. Infusion von $^{n}/_{11}$-Schwefelsäure.

Zeit	Atemtiefe ccm	Minutenfrequenz	Minutenvolumen ccm	CO_2-Tension %	p_H	[H˙]
Vor Infusion . . .	13,5	136	1836	5,06	7,042	$9,08 \cdot 10^{-8}$
Während Infusion	16,0	144	2304	2,64	7,033	$9,27 \cdot 10^{-8}$

Infolge abnormen Verhaltens des anscheinend etwas kranken Tieres und beginnender Gewinnung der Blutproben ist der Versuch nicht ganz zuverlässig.

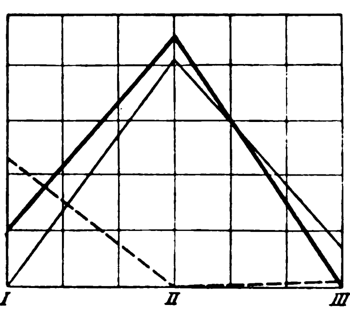


Fig. 4. Graphische Darstellung von Versuch 4 (entsprechend Fig. 1).

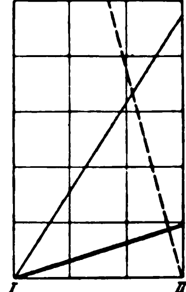


Fig. 5. Graphische Darstellung von Versuch 5 (entsprechend Fig. 1). Der abnorm hohe Anfangswert der CO_2-Tension ist nicht ganz ausgezeichnet.

Versuch 6.

2. XII. 14. **Infusion von 1% (= ca. $^n/_{10}$-) Milchsäure,**
hierauf " " $^n/_{15}$-Natronlauge.

Zeit	Atemtiefe ccm	Minutenfrequenz	Minutenvolumen ccm	CO_2-Tension %	p_H	$[H^{\cdot}]$
Vor Infusion 10h 49′	15	58	870	2,57	7,199	$6{,}32 \cdot 10^{-8}$
Inf. v. Milchs. 10h 54′	19	70	1330	2,31	7,101	$7{,}93 \cdot 10^{-8}$
Inf. v. Lauge 11h 07′	10 (Minimum)	68	680 (Minimum)	2,29	7,379	$4{,}18 \cdot 10^{-8}$

Versuch 7.

4. XII. 14. **Infusion von $^n/_{15}$-Natronlauge,**
hierauf " " Schwefelsäure.

Zeit	Atemtiefe ccm	Minutenfrequenz	Minutenvolumen ccm	CO_2-Tension %	p_H	$[H^{\cdot}]$
Vor Infusion 10h 49′	18	47	846	2,67	7,269	$5{,}38 \cdot 10^{-8}$
Inf. v. Lauge 10h 55′	16 (Minimum)	45	720 (Minimum)	1,71	7,382	$4{,}15 \cdot 10^{-8}$
Nach d. Inf. 11h 07′	22	49	1078	—	—	—
Inf. v. Säure 11h 13′	28	47	1316	3,02	6,995	$10{,}12 \cdot 10^{-8}$

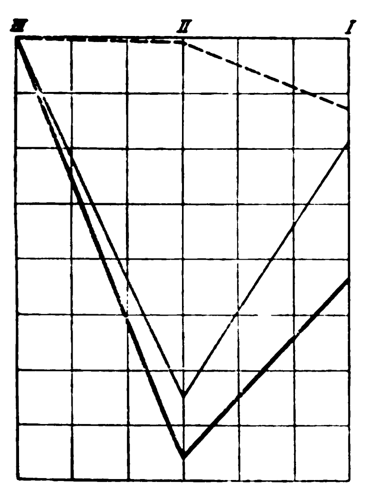


Fig. 6. Graphische Darstellung von Versuch 6 (entsprechend Fig. 2). I vor der Infusion, II während der Säureinfusion, III während der Laugeninfusion.

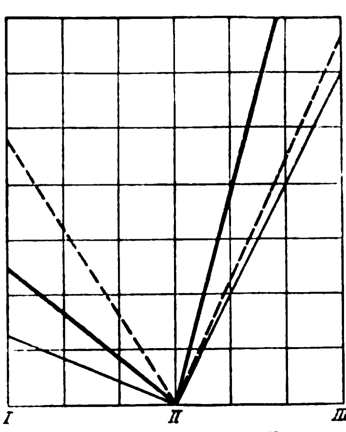


Fig. 7. Graphische Darstellung von Versuch 7 (entsprechend Fig. 2 u. 6). I vor der Infusion, II während der Laugeninfusion, III während der Säureinfusion.
Der abnorm hohe Wert von $[H^{\cdot}]$ bei III ist nicht ganz ausgezeichnet.

Nach der Infusion von Natronlauge stieg das Atemvolumen von selbst bedeutend an, offenbar infolge Steigerung der CO_2-Tension, die jedenfalls durch die oben erwähnte Zunahme des CO_2-Gehaltes der Inspirationsluft bei länger dauernden Versuchen bedingt war, und auf die zweifellos auch der hohe Wert der CO_2-Tension während der Säureinfusion zurückzuführen ist. Höchst wahrscheinlich hätte eine Untersuchung der CO_2-Tension unmittelbar vor der Säureinfusion auch hier eine Herabsetzung derselben unter dem Einfluß der letzteren ergeben.

Versuch 8.

5. XII. 14. Infusion von mit Kohlensäure gesättigter Kochsalzlösung, hierauf " " n/15-Salzsäure.

Zeit	Atemtiefe ccm	Minutenfrequenz	Minutenvolumen ccm	CO_2-Tension %	p_H	[H˙]
Vor Infusion 10h 05′	13	74	962	5,74 [1]	7,152	$7{,}05 \cdot 10^{-8}$
CO_2-Infusion 10h 11′	15	92	1380	3,74	7,119	$7{,}60 \cdot 10^{-8}$
Nach d. Inf. 10h 15′	13	80	1040	3,78	7,169	$6{,}78 \cdot 10^{-8}$
HCl-Infusion 10h 20′	17	98	1666	3,80	7,129	$7{,}43 \cdot 10^{-8}$

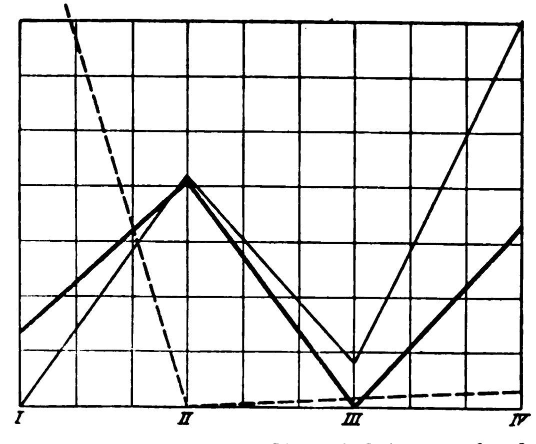


Fig. 8. Graphische Darstellung von Versuch 8 (entsprechend Versuch 1). I vor der Infusion, II während der CO_2-Infusion, III nach der Infusion, IV während der HCl-Infusion. Der abnorm hohe, vermutlich fehlerhafte Anfangswert der CO_2-Tension ist nicht ganz ausgezeichnet.

4. Deutung der Versuchsergebnisse.

Die im vorangehenden zusammengestellten Ergebnisse der acht Versuche erweisen, wie durch die graphische Darstellung

[1]) Dieser Wert ist abnorm hoch und vermutlich fehlerhaft, da das folgende Absinken des CO_2-Drucks bei Infusion der CO_2-Lösung unverständlich wäre.

in besonders klarer Weise veranschaulicht wird, auf das deutlichste den Zusammenhang, der zwischen der Größe der Lungenventilation und jener der [H˙] besteht. Eine Änderung der ersteren ist, mag es sich nun um eine durch die Infusion einer beliebigen Säure erzeugte Steigerung oder um eine durch die Infusion von Natronlauge erzeugte Herabsetzung derselben handeln, ausnahmslos von einer gleichsinnigen Änderung der [H˙] begleitet. Ganz anders dagegen verhält sich die CO_2-Tension des Blutes; sie kann in beliebiger Richtung variieren. In sämtlichen Versuchen mit Säureinfusion, mit Ausnahme von Versuch 7, geht mit der Steigerung der Atemgröße und [H˙] ein starker Abfall der CO_2-Tension, also eine Änderung in entgegengesetztem Sinne einher. Die Ausnahme in Versuch 7 ist, wie schon erwähnt, sicher auch nur eine scheinbare; denn hier war, wie das Versuchsprotokoll zeigt, bereits vor der Säureinfusion, nach Ablauf der Laugenwirkung das Atemvolumen sehr bedeutend, um mehr als 25 %, über den Anfangswert hinaus gestiegen, was nur durch eine entsprechende, aus irgendwelchen Gründen erfolgte Steigerung der CO_2-Tension zu erklären sein kann. Wäre die CO_2-Tension unmittelbar vor der Säureinfusion direkt gemessen worden, so hätte sich wohl auch hier ein Abfall und keine Steigerung derselben nachweisen lassen.

Nach Ablauf der Säureinfusion kann mit abnehmender Lungenventilation und [H˙] der CO_2-Druck des Blutes entweder wieder ansteigen, also wiederum im entgegengesetzten Sinne sich ändern, wie dies Versuch 1 mit seiner überhaupt sehr rasch abklingenden Säurewirkung zeigt, oder er bleibt in der Mehrzahl der Fälle (Versuch 3, 4, 6, 8) noch eine Zeitlang annähernd konstant auf dem erreichten niedrigen Niveau stehen. Dies wird ohne weiteres aus der Erwägung verständlich, daß die injizierte Säure ja nicht sogleich aus dem Blute entfernt wird, und daher hier künstlich der unter pathologischen Bedingungen so häufig zu beobachtende Zustand von „Acidosis“ herbeigeführt ist, bei welchem das „Säurebindungsvermögen“ des Blutes durch Vermehrung des Gehaltes an fixen Säuren herabgesetzt erscheint, die [H˙] des Blutes aber durch eine regulatorische Verminderung des CO_2-Drucks annähernd auf normalem Werte erhalten wird.

Bei der Infusion von Natronlauge erfolgt in beiden Versuchen die Änderung sämtlicher drei Faktoren (Atmungsgröße, [H˙] und CO_2-Druck) in gleichem Sinne; aber auch hier ist die Übereinstimmung zwischen der Änderung der Lungenventilation und jener der [H˙] eine bessere als mit jener der CO_2-Tension. In Versuch 2 verhält sich der Abfall der Lungenventilation zu der darauffolgenden Steigerung wie 1 : 2,7; für die [H˙] ist das entsprechende Verhältnis 1 : 3,4, für den CO_2-Druck 1 : 4,4. Noch viel deutlicher kommt dies in Versuch 7 zum Ausdruck; hier verhält sich der Abfall der Lungenventilation bei der Infusion von Natronlauge zu der während der Säureinfusion beobachteten Steigerung wie 1 : 4,7; für die [H˙] ist das Verhältnis 1 : 4,9, also fast genau das gleiche, für die CO_2-Tension dagegen 1 : 1,4.

Zeigen somit alle Versuche in vollster Übereinstimmung, daß es die [H˙] und nicht die CO_2-Tension ist, welche die Atmung regulieren — denn es wird sich wohl niemand zu der Annahme entschließen wollen, daß alle sechs ganz verschiedenen Säuren zufällig sämtlich einen „spezifisch" erregenden, und die Natronlauge zufällig einen spezifisch hemmenden Einfluß auf die Atmung ausüben —, so bliebe schließlich noch die Möglichkeit zu erwägen, ob die CO_2 nicht außer ihrer Wirkung als Säure vielleicht doch noch eine „spezifische" Wirkung auf die Atmung ausübt, die aber zu schwach ist, um gegenüber dem stärkeren regulatorischen Einfluß der [H˙] maßgebend zur Geltung kommen zu können. Aber auch diese Möglichkeit läßt sich auf Grund des vorliegenden Versuchsmaterials mit Sicherheit ausschließen. Würde die CO_2 eine auch nur schwache „spezifisch" erregende Wirkung auf die Atmung ausüben, dann müßte offenbar die CO_2 wirksamer sein als andere Säuren, d. h. es müßte bei Einwirkung von CO_2 bereits bei einer geringeren Steigerung der [H˙] eine entsprechende Verstärkung der Lungenventilation zu beobachten sein. Vergleicht man aber die im vorangehenden mitgeteilten Versuchsergebnisse mit jenen von Hasselbalch und Lundsgaard (l. c.), wo die Steigerung der [H˙] durch Einatmung von CO_2 bewirkt wurde, so ergibt sich, daß die Differenzen der die gleiche Steigerung der Lungenventilation bewirkenden [H˙] in den letzteren Versuchen durchaus nicht kleiner, meist sogar beträchtlich größer waren als in

unseren Versuchen. Das gleiche Resultat ergibt unser Versuch 8, in welchem zum Vergleich an ein und demselben Tier die erregende Wirkung einer Infusion von CO_2-Lösung mit jener einer HCl-Lösung verglichen wurde. Wie besonders in der graphischen Darstellung anschaulich hervortritt, ist die Steigerung der [H˙] in beiden Fällen fast genau die gleiche, die Verstärkung der Lungenventilation aber ist im zweiten Falle sogar noch größer als im ersten. Es ist also auch nicht die leiseste Andeutung eines „spezifisch“ erregenden Einflusses der Kohlensäure zu entdecken.

Daß die Zurückführnng der erregenden Wirkungen der Kohlensäure (soweit sie nicht reflektorischen Ursprungs sind) auf ihre Säurenatur das widerspruchsvolle Bild der CO_2-Vergiftung mit seinem Ineinandergreifen von Erregungs- und Lähmungserscheinungen mit einem Schlage aufklärt, habe ich bereits in meiner ersten Mitteilung (l. c. S. 181) nachdrücklich hervorgehoben.

Zum Schluß noch ein paar Worte über die Sauerstoffmangel-Dyspnoe. Der direkte Nachweis, daß auch die O-Mangel-Dyspnoe auf eine Steigerung der [H˙] in den Geweben zurückzuführen ist, hat sich leider nicht erbringen lassen aus Gründen, die bei näherer Überlegung leicht einzusehen sind. Erzeugt man bei einem Tier eine rasch einsetzende Dyspnoe, indem man es ein Gasgemisch von niedrigem O-Gehalt einatmen läßt, so erweist sich die [H˙] des Blutes nicht gesteigert, sondern im Gegenteil herabgesetzt. Dieses Verhalten war von vornherein zu erwarten, da ja die O-Mangel-Dyspnoe durch die Stoffwechselvorgänge, nämlich durch die Ansammlung von Erstickungsstoffen in den Atemzentren selbst ausgelöst wird, ohne daß eine Änderung in der Beschaffenheit des Blutes vorausginge. Die Steigerung der Lungenventilation aber muß zu einem Auswaschen der CO_2 aus dem Blute und damit zu einer Herabsetzung der [H˙] desselben führen. In der Tat erweist sich auch die CO_2-Tension des Blutes bzw. der Alveolarluft bei O-Mangel-Dyspnoe herabgesetzt, wie ja schon aus den Untersuchungen von Zuntz und Haldane und deren Mitarbeitern bekannt war.

Von meinen eigenen Versuchen seien die beiden folgenden als Beispiele angeführt: Ein unnarkotisiertes Kaninchen atmete

aus der Atmungsflasche ein Gasgemisch von ca. 7 % O-Gehalt. Die während der gleich einsetzenden Dyspnoe entnommenen Blutproben ergaben [H˙] = $1{,}56 \cdot 10^{-8}$ und CO_2-Tension = 1,65 %, bei darauffolgender Atmung gewöhnlicher Luft stieg die [H˙] auf $2{,}10 \cdot 10^{-8}$ und die CO_2-Tension auf 2,12 %. Es ist bemerkenswert, daß die [H˙] des Blutes in diesen Versuchen geringer war als in allen an narkotisierten Tieren ausgeführten Versuchen, ein Beweis, daß die Narkose mit Chloralhydrat auch die Erregbarkeit der Atemzentren herabsetzt, die infolgedessen die [H˙] des Blutes auf einem höheren Niveau erhalten. In einem zweiten Versuche atmete ein (mit Chloralhydrat narkotisiertes) Kaninchen eine Gasmischung von ca. 2 % O-Gehalt. Die [H˙] betrug $4{,}00 \cdot 10^{-8}$, die CO_2-Tension 1,08 %; bei darauffolgender Luftatmung stieg die [H˙] auf $5{,}42 \cdot 10^{-8}$ und die CO_2-Tension auf 1,34 %.

Da somit Versuche mit schnell eintretendem O-Mangel nicht zum Ziele führten, habe ich eine Reihe von Versuchen mit ganz allmählicher Entwicklung des O-Mangels in der Weise angestellt, daß das Tier aus der Atmungsflasche anfänglich entweder Luft oder ein Gasgemisch mit nur mäßig verringertem O-Gehalt atmete und der verbrauchte Sauerstoff durch Stickstoff ersetzt wurde (bei Absorption der ausgeschiedenen Kohlensäure). Allein auch diese Versuche verliefen ergebnislos. Denn erstens gelang es (vermutlich infolge der Änderungen der Körpertemperatur, des Narkosegrades und dgl. mehr) anscheinend nicht, die Erregbarkeit der Atemzentren durch mehrere Stunden ausreichend konstant zu erhalten, so daß sowohl [H˙] wie CO_2-Tension Änderungen bald in dem einen, bald in dem anderen Sinne aufwiesen, und zweitens waren die Erscheinungen der Dyspnoe entweder nur sehr wenig ausgesprochen oder fehlten auch vollständig. Diese letztere Tatsache, daß bei allmählicher Entwicklung des O-Mangels (unter Vermeidung von CO_2-Anhäufung) die sonst auftretende Dyspnoe mehr oder minder gänzlich fehlen kann, eine Erscheinung, die schon von früheren Autoren, insbesondere von Haldane und Poulton[1]) beobachtet wurde, bildet neben der von mir festgestellten Erstickung in Apnoe

[1]) J. S. Haldane und E. P. Poulton, The effects of want of oxygen on respiration. Journ. of Physiol. 37, 390, 1908.

bei kontinuierlicher Durchspülung neugeborener Tiere mit O-freier Lösung (vgl. die I. Mitteilung) den sichersten Beweis dafür, daß die Atemzentren nicht durch den O-Mangel als solchen, sondern nur durch eine Anhäufung von Erstickungsstoffen (d. h. bei O-Mangel auftretenden Produkten unvollkommener Oxydation) in Erregung versetzt werden. Wenn bei ganz langsamer Entwicklung des O-Mangels die Erstickungsstoffe Zeit haben, in dem Maße, in dem ihre Bildung erfolgt, in das Blut herauszutreten, dann unterbleibt ihre Anhäufung in den Zentren und damit auch die durch sie hervorgerufene Verstärkung der Lungenventilation. Die Menge der in den Zentren gebildeten Erstickungsstoffe ist aber offenbar zu gering, als daß sie bei ihrem Übertritt in den allgemeinen Kreislauf eine ausreichende Veränderung der Blutreaktion veranlassen könnten, und damit ist auch die Möglichkeit genommen, durch den Nachweis einer solchen die Ursache der O-Mangel-Dyspnoe unter diesen Verhältnissen direkt darzutun.

Wenn der O-Mangel aber in mäßigen Graden lange anhält, wie dies beim Aufenthalte im Hochgebirge der Fall ist, dann kommt es in der Tat durch die andauernde Bildung saurer Erstickungsstoffe, an der sich dann wohl außer den Nervenzentren auch die minder empfindlichen Gewebe, vor allem die Muskeln beteiligen, zu einem von zahlreichen Autoren festgestellten Zustande von Acidosis, bei dem das Säurebindungsvermögen die „Titrationsalkalinität" und die CO_2-Spannung des Blutes herabgesetzt, die Lungenventilation dagegen gesteigert ist. Wenn nun auch direkte Bestimmungen der $[H^{\cdot}]$ im Hochgebirge bisher nicht vorzuliegen scheinen, so lehren doch einfache Erwägungen, daß keinerlei Anlaß vorliegt, für diese „Hochgebirgs-Dyspnoe" (ebenso wie für den ganz analogen und durch die gleichen Erscheinungen gekennzeichneten Zustand der „Arbeits-Dyspnoe") irgendwelchen anderen Faktor als eine entsprechende Änderung der Blutreaktion verantwortlich zu machen. Wie schon früher erwähnt worden, beobachtete Barcroft unter diesen Bedingungen eine Änderung der Dissoziationskurve des Blutes, wie sie durch eine Steigerung des CO_2-Drucks um 2 mm hervorgerufen würde. Nach den in vitro ausgeführten Versuchen von Hasselbalch und Lundsgaard würde dies einer Steigerung der $[H^{\cdot}]$

des Blutes um $0{,}13 \cdot 10^{-8}$ entsprechen; in den von denselben Autoren am lebenden Tier ausgeführten Versuchen sind die den Steigerungen des alveolaren CO_2-Drucks um einen derartigen Betrag entsprechenden Steigerungen der [H˙] zum Teil 3 mal so groß; 0,4 bis $0{,}7 \cdot 10^{-8}$ aber sind Differenzen der [H˙], denen in einem Teile der vorangehenden Versuche (vgl. Versuch 1, 3, 4, 8) bei tief narkotisierten Tieren mit verminderter Erregbarkeit des Atemzentrums eine Vermehrung der Lungenventilation entspricht, wie sie im Hochgebirge von Barcroft beobachtet wurde (ca. 50%). Somit gibt die aus der Dissoziationskurve des Blutes erschlossene Steigerung der [H˙] auch hier eine völlig zureichende Erklärung für die beobachtete Verstärkung der Atmung.

Vor kurzem haben Hasselbalch und Lindhard[1]) die Herabsetzung der alveolaren CO_2-Spannung bei Luftverdünnung in der pneumatischen Kammer studiert und in einem vorläufigen Versuche auch die [H˙] bei zwei Versuchspersonen bei normalem und bei herabgesetztem Luftdruck bestimmt. Es ergab sich in der Tat das Vorhandensein einer Acidose (Herabsetzung des p_H bei konstanter CO_2-Spannung von 7,51 auf 7,47 bzw. 7,44), die durch die kompensatorische Verminderung des CO_2-Drucks fast völlig aufgehoben wurde, so daß die tatsächliche Reaktion des Blutes ([H˙] bei alveolarer CO_2-Spannung) fast konstant blieb (p_H von 7,51 auf 7,49 und von 7,50 auf 7,48 herabgesetzt), mithin genau das Verhalten, das vom Standpunkte der Reaktionstheorie erforderlich erscheint. Es ist somit kaum zu bezweifeln, daß die Reaktionstheorie für die Sauerstoffmangel-Dyspnoe in der gleichen Weise zu Recht besteht wie für die Kohlensäure-Dyspnoe.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Es wurden Versuche mit Infusion von Säuren (Salzsäure, Schwefelsäure, Phosphorsäure, Essigsäure, Milchsäure, Kohlensäure) und von Natronlauge in das Blut angestellt und die gleichzeitigen Änderungen der Lungenventilation, der [H˙] und der CO_2-Tension des Blutes gemessen. Es ergab sich, daß die

[1]) K. A. Hasselbalch und J. Lindhard, Zur experimentellen Physiologie des Höhenklimas. II. Diese Zeitschr. 68, 265, 1915.

bei Säureinfusion zu beobachtende Steigerung und die bei Laugeninfusion auftretende Verminderung der Lungenventilation stets mit einer gleichsinnigen Änderung der [H˙] des Blutes einhergeht, während die CO_2-Tension sich ungleichmäßig verhält und bei Säureinfusion meist eine Änderung in entgegengesetzter Richtung erfährt. Dies ist ein neuer Beweis für die Richtigkeit der „Reaktionstheorie“, nach der die Kohlensäure keine „spezifisch“ erregende Wirkung auf die Atmung ausübt, sondern die [H˙] des Blutes den chemischen Regulator der Atmung darstellt, welch letztere mithin auch umgekehrt die Aufgabe hat, die Reaktion des Blutes konstant zu erhalten.

Untersuchungen über den Koeffizienten des osmotischen Druckes von Bombyx mori L. während des ganzen Zeitraumes seiner Entwicklung.

Von

Osw. Polimanti.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Perugia.)

(Eingegangen am 16. März 1915.)

Mit 1 Figur im Text.

Das Ziel dieser Arbeit war, zu studieren, wie sich der osmotische Druck während der ganzen Entwicklung von Bombyx mori verhält, d. h. vom Ei an, sobald es vom Schmetterling gelegt ist, indem der Druck nach und nach während aller seiner charakteristischen Phasen, in der Larve, in der Puppe und im Schmetterling untersucht wurde. Dieses Studium, das bis jetzt noch nicht durchgeführt worden ist, kann gewiß von großem Nutzen sein, weil wir dabei viele Erscheinungen beobachten, die während der Entwicklung der Tiere im allgemeinen und speziell der Insekten eintreten, vor allem aber bei diesem Tiere, da ja die Seidenwürmerzucht bei vielen Völkern ein wichtiger Erwerbszweig ist.

Damit man die erhaltenen Resultate richtig versteht, muß ich hier an die physiologischen Erscheinungen erinnern, die während des ganzen Zeitraumes der Entwicklung von Bombyx mori eintreten, weil wir ohne die Kenntnis dieser Erscheinungen uns das, was wir beobachtet haben, schwer erklären können. Wer diese Frage, die ich in aller Kürze behandle, gründlich studieren will, der kann mit Nutzen die im Jahre 1856 veröffentlichte Abhandlung von Cornalia[1]) und das Handbuch von Verson und Quajat[2]) zu Rate ziehen.

---

[1]) E. Cornalia, Monografia del Bombice del gelso. Memoria del R. Istituto Lombardo 1856, serie 3a, Vol. VI, p. 1.

[2]) Verson e Quajat, Il filugello e l' arte sericola (Padova-Verona, Drucker 1896).

Im Leben des Eies von Bombyx mori lassen sich drei Phasen oder Perioden unterscheiden, die sowohl vom morphologischen als vom funktionellen Gesichtspunkt ganz verschieden sind. Die erste Periode, die wir die der Ästuation nennen können, beginnt mit der Befruchtung, umfaßt die ganze erste Woche nach der Ausstoßung des Eies, während welcher seine Farbe sich allmählich von hellgelb zu aschfarbenem Weiß ändert, und dauert während einer nicht gut bestimmbaren Zeit fort, die je nach der Außentemperatur mehr oder minder lang sein kann. Die zweite Periode umfaßt die ganze Dauer des „Winterschlafes“ oder das „latente Leben“, d. h. den ganzen Winter. Die dritte Periode endlich beginnt mit dem Frühjahr, umfaßt die ganze Zeit der Bebrütung und endet mit der Dehiscenz des Eies und der Geburt des Bombyx. Vom morphologischen Gesichtspunkte fällt nach den Untersuchungen der Embryologen[1]) die Periode der Ästuation zusammen mit der Bildung und dem Reifwerden des Keimes, d. h. mit den Veränderungen, die im Ei durch die befruchtende Wirkung der Nemaspermen herbeigeführt werden, mit der Segmentierung des Dotters, mit der Bildung des Blastoderms und den ersten Anlagen des Embryos mit Einschluß des Amniumsackes und der serösen Membran. Die Periode des Winterschlafes unterscheidet sich durch das Fehlen morphologischer Veränderungen, die mit den Mitteln, über die wir heutzutage verfügen, erkennbar sind, insofern als das unter dem Mikroskop beobachtete Ei am Ende des Winters keine größere Entwicklung zeigt als im Herbste, d. h. ehe dieser Zustand von latentem Leben beginnt. Die Periode der Bebrütung fällt zusammen mit dem allmählichen Wiedererwachen der Entwicklungstätigkeit des Eies, infolge deren die folgende Entwicklung des Embryos eintritt, die sich mit wachsender Geschwindigkeit in den der Entstehung der Larve vorausgehenden Tagen und im Verhältnis zur ansteigenden Außentemperatur vollzieht.

Es ist schwer, die Dauer der fünf Lebensalter der Larve oder der vier Verwandlungen genau zu bestimmen, weil Ursachen vorhanden sind, die die erwähnte Dauer verlängern oder verkürzen können; diese Ursachen sind die Zahl der Fütte-

---

[1]) Siehe vollständige Literatur bei Verson u. Quajat, loc. cit. S. 178 bis 180.

rungen und die Temperatur des Aufbewahrungsraumes der Seidenwürmer. Es läßt sich jedoch als allgemeine Regel aufstellen — auch nach zahlreichen eigenen Beobachtungen —, daß, wenn die Umgebungstemperatur ca. 22° C beträgt und die Tiere alle 2 Stunden (mit Ausnahme der späten Nachtstunden) gefüttert werden, die Dauer der einzelnen Lebensalter die folgende ist:

1. Lebensalter	(von der Geburt bis zur 1. Verwandlung)	5 bis 6 Tage
2. „	(„ „ 1. „ „ 2. „)	4 „ 5 „
3. „	(„ „ 2. „ „ 3. „)	4 „ 5 „
4. „	(„ „ 3. „ „ 4. „)	5 „ 7 „
5 „	(„ „ 4. Veränderung bis zur Maternität)	7 bis 9 bis 12 Tage.

Wenn bei den Seidenraupen die Lebhaftigkeit nachzulassen beginnt, ist dies ein deutliches Zeichen, daß sie der Betäubung nahe sind und in den Erstarrungszustand eintreten, der periodisch 4 mal während der ganzen Entwicklung der Raupe eintritt, welche Perioden dazu dienen, die fünf Lebensalter der Seidenraupe deutlich zu unterscheiden.

Dann folgt die sogenannte „Reinigung“, während welcher Zeit (im Durchschnitt 2 bis 3 Tage) der Seidenwurm keine Maulbeerblätter als Nahrung zu sich nimmt und aus seinem Verdauungsrohr alle darin enthaltenen Stoffe entleert, indem er auf diese Weise bis zu 12 % seines Gewichtes verliert.

Endlich hört er auf, seinen Platz zu wechseln, kommt für einige Zeit zur Ruhe, tritt in den sog. „Seidenschlaf“ ein, wird klein und durchscheinend infolge der enormen Entwicklung der seidespinnenden Drüsen; der Seidenwurm ist „reif“.

An diesem Punkte angelangt, verläßt der Seidenwurm sein Bett, was er nie während der ganzen Dauer seines Lebens tut, und steigt zum Spinnen des Kokons, um sein sechstes Lebensalter zu vollenden und sich in eine Puppe zu verwandeln. In diesem Zustand wird er sehr lebhaft und ist nicht langsam wie im früheren Leben. In 3 Tagen ist der Kokon gewöhnlich fertig und die Larve bleibt noch verkleinert; sie wird dann unbeweglich.

Nach und nach wandelt sich die Larve in eine männliche oder weibliche Puppe um und verbleibt in diesem Zustand im Durchschnitt 5 Tage, indem sie so die fünfte Verwandlung und

ihr sechstes Lebensalter durchmacht, wobei ihr Gewicht bis zur Hälfte reduziert wird.

Zuletzt erfolgt die Umwandlung der Puppe in einen männlichen oder weiblichen Schmetterling (Imago), indem sie auf diese Weise die sechste und letzte Verwandlung und ihr siebentes Lebensalter durchmacht; diese Umwandlung dauert im Durchschnitt 8 Tage.

Das Leben des Schmetterlings ist bei beiden Geschlechtern ziemlich kurz, denn sobald die Begattung und die darauffolgende Legung der Eier stattgefunden hat, lebt der männliche Schmetterling im Durchschnitt noch 7 bis 8 Tage, der weibliche im Durchschnitt noch 8 bis 9 bis 10 Tage. Ich habe konstant beobachtet, daß der weibliche Schmetterling auch stirbt, ehe er alle Eier gelegt hat, die von den verschiedenen Schmetterlingen in Reihen und bisweilen auch in mehr oder minder hohen Schichten hingelegt werden. Hier ist zu bemerken, daß die Dauer der verschiedenen Lebensalter und der verschiedenen Verwandlungen nicht nur von der Bombyxrasse, sondern auch von äußeren Einflüssen, insbesondere von der Temperatur, abhängt.

Untersuchungen über den Koeffizienten des osmotischen Druckes der Larve des Seidenwurmes wurden nur bezüglich des Blutes bei schon ziemlich entwickelten Tieren (5. Lebensalter) von Ducceschi[1]) vorgenommen, der ihn als gleich 0,470 bis 0,480° bestimmte. Die fragmentarische Untersuchungen des genannten Autors können uns jedoch nur als Kontrolle und auch noch sehr wenig dienen, weil, wie wir später sehen werden, diese Resultate Ducceschis keinen Beitrag zur Lösung des biologischen Problems liefern, d. h. der Frage, wie sich der Koeffizient des osmotischen Druckes während der ganzen Entwicklung des Seidenwurms verhält.

Die Studien über die Hämatologie der Insekten und insbesondere des Seidenwurms haben die Forscher nur wenig zu Beobachtungen veranlaßt, die deshalb selten und auch dann sehr lückenhaft sind, so daß sich kein passender, unumgänglich notwendiger Vergleich, der uns zu endgültigen Schlußfolgerungen führt, aufstellen läßt. Dies gilt sowohl hinsichtlich der Anatomie als auch der Physiologie des Blutes der Insekten. Was die Hämatologie des Seidenwurms anbelangt, müssen hier außer den Untersuchungen Ducceschis die Studien von Verson und

[1]) V. Ducceschi, Il sangue del Bombyx mori allo stato larvale. Atti della R. Accademia dei Georgofili. Anno XXV, Vol. LXXX, IV serie 1902, p. 365—382.

Quajat[1]), Fredericq[2]), Nazari[3]) erwähnt werden. Die von Cuénot[4]), v. Fürth und Schneider[5]) betreffen das Studium des Blutes anderer Insekten und stehen deshalb nur in indirekter Beziehung zu meinen Versuchen. Ich stelle hier in Gestalt einer Tabelle die Resultate zusammen, die die physikalischen nnd chemischen Merkmale des Blutes von Bombyx mori betreffen (die Untersuchungen beziehen sich fast ausschließlich auf das Blut der Larven im 4. bis 5. Lebensalter).

1. Menge: $^1/_5$ des Gesamtgewichtes der Larve im 5. Lebensalter (Fredericq-Nazari).
2. Spezifisches Gewicht: 1032 (Fredericq); 1041 (Nazari); 1037 bis 1039 (Ducceschi). Mittel: 1037.
3. Reaktion: saure, gleich 0,46 g Oxalsäure $^0/_0$ Blut (Nazari). (Die Acidität stammt nach Poulton von einer flüchtigen Säure, vielleicht Ameisensäure, her).
4. Gesamtstickstoff: 0,833 g $^0/_0$ Blut (Nazari).
5. Wasser und feste Körper: 8,703 g feste Körper (Fredericq), (Werte $^0/_0$ g Blut) 88,289 g Wasser, 11,711 g feste Körper (Nazari); 10,504 g Wasser, 9,963 g feste Körper (Ducceschi); Mittel $^0/_0$ feste Körper: 10,220 g.
6. Asche 6,025 g $^0/_0$ Trockenrückstand gleich 0,705 g Asche $^0/_0$ Blut (Nazari); 6,112 g (Ducceschi).

Die interessante Tatsache, die bei Bombyx mori zu konstatieren ist, besteht darin, daß sein Verdauungssaft alkalische, sein Blut dagegen saure Reaktion hat.

Ducceschi stellte auch Untersuchungen an über die im Blute von Bombyx enthaltenen Eiweißstoffe (Globuline, Albumine), die er als gleich 3,833 g $^0/_0$ bestimmte; auch bestimmte er ihren Gerinnungspunkt.

In letzter Zeit wurden Untersuchungen über den osmotischen Druck bei den Insekten von Backmann[6]) angestellt. Diese Untersuchungen

---

[1]) Verson e Quajat, Il filugello e l' arte sericola. Verona 1896, pag. 143 e seg.

[2]) L. Fredericq, Sur le sang des insectes. Bulletin de l'Académie royale de Belgique. 3 Sér. 1881. I. p. 487. Travaux de Laboratoire. T. V. 1896.

[3]) A. Nazari, Il sangue del Bombyx mori allo stato larvale. Atti della R. Accademia dei Georgofili. Firenze IV. Serie, Anno XXV (Vol. LXXX), 1902, p. 356—363.

[4]) L. Cuénot, Étude sur le sang et les glandes lymphatiques dans la série animale. II. Invertébrés. Archives de Zoologie expérimentale. 2° Série. T. X. 1891, p. 365—641.

[5]) v. Fürth und Schneider, Über tierische Tyrosinasen. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 1, 229, 1901.

[6]) E. L. Backmann, Der osmotische Druck bei einigen Wasserkäfern. Centralbl. f. Physiol. 25, 779 bis 782, 1911. — Derselbe, Über den osmotischen Druck der Libellen während ihrer Larven- und Imagostadien. Centralbl. f. Physiol. 25, 835 bis 837, 1911. — Derselbe, Über die Entstehung der homoiosmotischen Eigenschaften. Centralbl. f. Physiol. 25, 837 bis 843, 1911.

muß ich, wenn auch in aller Kürze, anführen, weil sie in direkter Beziehung zu diesen meinen Studien stehen und, wie wir später sehen werden, diese meine Untersuchungen ergänzen und bestätigen können.

In seiner ersten Arbeit stellte Backmann Untersuchungen an über den Gefrierpunkt der Hämolymphe einiger Wasserinsekten, für den er die folgenden Werte fand:

Art der Tiere:	Δ der Hämolymphe:
Dytiscus circumcinctus	0,56
Dytiscus marginatus	0,95
Cymatopterus striatus	0,69
Cymatopterus paykulli	0,56
Acilius sulcatus	0,49
Mittel	0,65

Das Δ der Hämolymphe dieser Wasserinsekten variiert also zwischen 0,49 und 0,95 mit einem Mittel von 0,65. Bemerkenswert ist mithin die Tatsache, daß das Δ der Hämolymphe von Art zu Art sehr veränderlich ist. Als diese Wasserkäfer unter verschiedenen Versuchsbedingungen: Hunger, im Trocknen, in destilliertem Wasser, in mehr oder minder konzentrierter NaCl- oder Zuckerlösung, gehalten wurden, behielten sie stets denselben osmotischen Druck bei.

Deshalb gelangte Backmann zu der Schlußfolgerung (I, 781 bis 782): „Die Wasserkäfer können mithin als unter physiologischen Verhältnissen vollständig homoiosmotische Tiere angesprochen werden, obschon sie nur die Eigenschaften besitzen, die notwendig sind, um während eines Lebens in Süßwasser den eigenen osmotischen Druck unverändert bewahren zu können."

Backmann bestätigte dieses Gesetz in seiner dritten Abhandlung, in der er gerade diese Frage von einem theoretischen Gesichtspunkt aus behandelte.

In seiner zweiten Abhandlung behandelte Backmann experimentell eine Frage, die in Beziehung zu unserem Thema steht; er wollte nämlich sehen, wie sich der osmotische Druck bei den Libellen während ihrer Metamorphose verhält. Sie sind, wie uns wohlbekannt ist, als Larven Süßwassertiere, als Imagines Landtiere. Er unternahm Untersuchungen bei Cordelia aenea und Leucorrhinia dubia, wobei er die folgenden Resultate erhielt:

Δ Hämolymphe der Larven (Larvenstadium):	
Libellula-Larven	0,63
Aeschna-Larven	0,56
Mittel	0,595

Δ Hämolymphe der Imagines (Imagostadium):	
Cordelia aenea	0,67
Leucorrhinia dubia	0,63
Mittel	0,655

Untersuchungen über den Gefrierpunkt mit Hämolymphe von etwa 80 Larven ergaben als Wert von $\Delta = 0,765$.

Backmann schließt also aus diesen Untersuchungen, daß die Libellen den osmotischen Druck vor und nach ihrer Metamorphose konstant und unveränderlich beibehalten, obwohl sie in so verschiedenen Medien leben, und daß sie mithin unter physiologischen Verhältnissen als homoiosmotische Tiere anzusprechen sind.

Werden die Larven in konzentrierte NaCl-, Zuckerlösungen, ins Trockne gebracht, so behalten sie den osmotischen Druck auch verhältnismäßig konstant bei. Die Libellen jedoch können während ihrer Metamorphose sich sehr salzarmen Medien anpassen (als Beispiel führt er die Skälbybucht bei Kalmar an, wo der Gehalt an Salzen im Wasser 0,5 % beträgt mit einem $\Delta = 0{,}30$, und wo eben Libellen in verschiedenen Entwicklungsstadien leben).

Auch ich habe im Jahre 1911, im August, den Gefrierpunkt des Blutes einiger Insekten mit derselben Methode aufgesucht, wie ich sie bei diesen Untersuchungen über Bombyx mori befolgt habe und später beschreiben werde; dabei fand ich die folgenden Resultate, die ich jetzt zum ersten Male veröffentliche:

Lymanthria dispar (Mittel von 50 Exemplaren)	0,48
Decticus albifrons Fabr. (Mittel von 45 Exemplaren) . .	0,50
Mittel	0,49

Wie man also aus den angeführten Resultaten ersieht, die eben Untersuchungen über den Koeffizienten des osmotischen Druckes des Blutes verschiedener Insekten betreffen, variiert dieser von einem Minimum von 0,47 bis zu einem Maximum von 0,95 mit einem allgemeinen Mittel von 0,554.

Das ganze Versuchsmaterial für diese Untersuchungen, Eier, Larven, Puppen, Schmetterlinge, wurde mir in liebenswürdiger Weise durch Herrn Dr. G. Bellini in Perugia geliefert, einen der hervorragendsten Seidenwurmzüchter Italiens, dem ich hier meinen tiefgefühlten Dank ausspreche. Ich experimentierte also während des ganzen Jahres 1914 an einem vollkommen homogenen Material, das ganz aus einer und derselben Zucht herstammte und denselben Einflüssen des umgebenden Mediums ausgesetzt gewesen war. Es ist klar, daß bei Untersuchungen von dieser Art die Tatsache einer solchen Möglichkeit von der größten Bedeutung war; aus diesem Grunde erlangen meine Untersuchungen einen hohen beweiskräftigen Wert, und man muß als gewiß annehmen, daß sie von Irrtümern frei sind.

Der Apparat, der mir zur Bestimmung des Koeffizienten des osmotischen Druckes diente, war der von Burian-Drucker, der eben eine minimale Flüssigkeitsmenge verlangt. Das mit Stickstoff gefüllte Thermometer war in $^1/_{50}$-Grade abgeteilt; als

Kältegemisch wurde mit einer gesättigten Kochsalzlösung vermischtes Eis verwendet, das die Temperatur auf — 2 bis — 3° erniedrigte. Die Eier, die Larven in den ersten Perioden der Entwicklung, die Puppen und die Schmetterlinge wurden fein zerrieben, worauf an dem Brei die Bestimmung des Koeffizienten des osmotischen Druckes vorgenommen wurde. Nur bei den schon ziemlich großen Larven (dies wird bei den Resultaten, die ich später anführen werde, angegeben) wurde diese Bestimmung am Blute ausgeführt. Die Entblutung erhielt ich, indem ich gegen seine Basis hin mit feiner Schere das Hörnchen des vorletzten Bauchsegmentes, das der bulbären Enderweiterung des pulsierenden Gefäßes entspricht, durchschnitt.

Die Gegend des Hörnchens, das sich auf dem vorletzten Bauchsegment befindet und mit dem pulsierenden Gefäß in Verbindung steht, bietet die beste Gelegenheit zur Blutentnahme, weil auf diese Weise vermieden wird, daß Elemente der anderen Gewebe sich mit dem Blute vermischen, wie es leicht eintritt, wenn man z. B. die Ankerflügel einschneidet. Die einzige Gefahr, der man sich zuweilen aussetzt, besteht darin, daß man einige Malpighiröhren durchschneidet, aber man wird sofort darauf aufmerksam gemacht durch die Trübung des Blutes, die von den aus den Malpighiröhren selbst herkommenden kleinen Krystallen herrührt. Bei allen meinen Untersuchungen habe ich stets diese Methode befolgt.

Oft wurde gleichzeitig mit dem des Blutes der Koeffizient des osmotischen Druckes der entbluteten Larve bestimmt, um die möglichen Unterschiede zu studieren.

Die Eier wurden während der Erstarrung in der Winterszeit bei der Temperatur von 0° bis + 1° gehalten. In den ersten Tagen des Monats Mai wurden die Eier in ein Medium gebracht, dessen Temperatur 22° betrug; diese Temperatur wurde bis zur vollständigen Entwicklung der Larve und ihrer Umwandlung in Puppe und Schmetterling konstant erhalten. Die Fütterungen mit Maulbeerblättern wurden stets regelmäßig so verteilt, daß die Larven nie Mangel litten; kurz, sie wurden auf eine möglichst rationelle Weise gezüchtet.

In Gestalt einer Tabelle und als Schemata bringe ich die Resultate, die ich bei diesen Untersuchungen über den Koeffizienten des osmotischen Druckes erhalten habe.

Tabelle I.

Tage des Lebensalters der Larven	Zahl der untersuchten Larven	Gefrierpunkt °C	Bemerkungen
		0,690	Eier in Erstarrung
		0,665	Soeben geborene Seidenwürmch.
0	70	1,216	
1	60	1,175	
2	60	1,235	
3	60	1,240	
4	60	1,260	
5	50	1,260	
6	45	1,290	
7	40	1,780	1. Schlaf
8	35	1,420	1. Schlaf
9	60	1,240	1. Schlaf
10	25	0,840	
11	35	1,100	
12	40	1,000	
13	45	0,840	
14	45	0,760	2. Schlaf
15	40	0,753	2. Schlaf
16	45	0,728	2. Schlaf
17	48	0,800	
18	50	0,620	
19	45	0,835	
20	25	0,840	
21	30	0,710	3. Schlaf
22	42	0,780	3. Schlaf
23	20	0,780	
24	18	0,697	
25	15	0,700	
26	15	0,695	
27	15	0,679	
28	14	0,689	

Tage des Lebensalters der Larven	Zahl der untersuchten Larven	Gefrierpunkt °C	Bemerkungen
29	15	0,700	4. Schlaf
30	15	0,688	4. Schlaf
31	15	0,700	4. Schlaf
32	5	0,805	
33	5	0,690	Nicht geronnener Blutteil
33		0,715	Blut in toto
33		0,830	Entblutete Larve
33	5	0,772	Ganze Larve
34	5	0,700	Blut in toto
34		0,900	Entblutete Larve
34	5	0,800	Ganze Larve
35	5	0,720	Blut in toto
35		0,875	Entblutete Larve
35	5	0,797	Ganze Larve
36	5	0,665	Blut in toto
36		0,820	Entblutete Larve
36	5	0,742	Ganze Larve
37	5	0,620	Blut in toto (Larven hungern seit 10 Std.)
37		0,720	Dieselben entbluteten Larven
37	5	0,660	Blut in toto (normale Larven)
37		0,800	Dieselben entbluteten Larven
37	5	0,730	Ganze Larve
38	5	0,673	Blut in toto
38		0,810	Dieselben entbluteten Larven
38	5	0,741	Ganze Larve
39	5	0,520	Purgation: Blut von reiferen Larven
39		0,540	Purgation: Dieselben Larven entblutet
39	5	0,530	Purgation: Ganze Larve

Tage des Lebensalters der Larven usw.	Zahl der untersuchten Larven usw.	Gefrierpunkt °C	Bemerkungen
39	5	0,605	Purgation: Blut von weniger reifen Larven (wenig Blut erhalten)
39		0,620	Purgation: Dieselben Larven entblutet
39	5	0,612	Purgation: Ganze Larven
40	5	0,620	Purgation: Ich erhalte kein Blut mehr; ganze Larve
41	5	0,620	Spinnen d. Kokons: Sind schon mit dem Spinnen des Kokons beschäftigt, weil die Larven auf die Zweige gestiegen sind. Spinnen den Kokon, während die Larve sich allmählich in eine Puppe verwandelt
42	5	0,625	Spinnen d. Kokons
43	5	0,625	Spinnen d. Kokons
44	5	0,700	Larven, die nicht mehr spinnen, aber noch nicht im vollständigen Puppenzustand sind
44	3	0,690	Larven, die entblutet wurden, gesponnen haben, aber die Merkmale der Puppe noch nicht angenommen haben
47	10	0,655	(Mittel) Vollkommene Puppe: 5. ♂ Puppe 0,632; 5. ♀ Puppe 0,678
48	5	0,744	(Mittel) Vollkommene Puppe: 5. ♂ Puppe 0,700; 5. ♀ Puppe 0,788
50	5	0,750	(Mittel) Vollkommene Puppe: 5. ♂ Puppe 0,703; 5. ♀ Puppe 0,797
60–61	3	0,680	Kleine ♂ Puppe } Mittel 0,660
60–61	3	0,640	Sehr große ♂ Puppe } Mittel 0,660
60–61	3	0,740	Puppe von normaler mittlerer Größe ♀
60–61	2	1,060	♀ Puppe einer entbluteten Larve
63–64	5	0,755	♀ Schmetterlinge
63–64	5	0,728	♂ Schmetterlinge
63–64	5	0,790	♀ Schmetterlinge, nachdem die Eier gelegt waren
63–64	5	0,730	♂ Schmetterlinge nach der Begattung
64	150	0,650	Eier von gelber Farbe
69	150	0,660	Eier von aschgelber Farbe
69–70	150	0,680	Eier, aschfarben

Tabelle II.

Mittel aus den über den Koeffizienten des osmotischen Druckes angestellten Beobachtungen.

Fortlfde. Nr.	Alter	Tage	Δ	Unterschiede von der vorhergehend. Zahl
1	Eier in Erstarrung		0,690	
2	Eier wenige Tage vor dem Entstehen der Larve		0,665	— 0,025
3	Von dem Entstehen der Seidenwürmchen bis zum 1. Schlaf (I. Lebensalter)	7	1,239	+ 0,574
4	1. Schlaf	3	1,480	+ 0,241
5	Vom 1. bis zum 2. Schlaf (II. Lebensalter)	4	0,945	— 0,535
6	2. Schlaf	3	0,747	— 0,198
7	Vom 2. bis zum 3. Schlaf (III. Lebensalter)	4	0,773	— 0,026
8	3. Schlaf	2	0,745	— 0,028
9	Vom 3. bis zum 4. Schlaf (IV. Lebensalter)	6	0,706	— 0,039
10	4. Schlaf	3	0,696	— 0,010
11	Vom 4. Schlaf bis zur Purgation (V. Lebensalter)	7	0,796	+ 0,100
12	Purgation	2	0,571	— 0,225
13	Spinnen des Kokons	3	0,623	+ 0,052
14	Übergang von der Larve zur Puppe		0,695	+ 0,072
15	♀ Puppen		0,749	
16	♂ Puppen		0,671	
17	Mittel der Puppen ♀ ♂		0,710	+ 0,015
18	♀ Schmetterlinge		0,772	
19	♂ Schmetterlinge		0,729	— 0,043
20	Mittel der ♀ ♂ Schmetterlinge		0,750	
21	Unterschied zwischen dem Mittel der Puppen und dem Mittel der Schmetterlinge (21—17)			+ 0,040
22	Eier von gelber Farbe, soeben gelegt		0,650	
23	Eier, gelb-aschfarben		0,660	+ 0,010
24	Eier, aschfarben		0,680	+ 0,020
25	Mittel aus 3—4 (1,239—1,480)		1,364	
26	Mittel aus 3—4—5 (1,239—1,480—0,945)		1,154	
27	Unterschied zwischen dem Mittel aus 3—4 und dem Mittel aus 6—11 (1,364—0,743)			+ 0,621
28	Unterschied zwischen dem Mittel aus 3, 4 und 5 (1,304—0,945)			+ 0,419
29	Unterschied zwischen dem Mittel aus 3—5 und dem Mittel aus 6—11 (1,154—0,743)			+ 0,411
30	Unterschied zwischen dem Mittel aus 6—11 und 5 (0,945—0,743)			+ 0,202
31	Mittel des Koeffizienten des osmot. Druckes in den verschied. Lebensaltern (3, 5, 7, 9, 11)		0,891	
32	Mittel des Koeffizienten des osmot. Druckes in den verschied. Schlafzeiten (4, 6, 8, 10)		0,917	
33	Unterschied zwischen dem Koeffizienten des osmot. Druckes in den verschied. Schlafzeiten und in den verschied. Lebensaltern (32—31) (0,917—0,891)			+ 0,026
34	Mittel des Koeffizienten des osmot. Druckes des Blutes der Larven des V. Lebensalters		0,688	
35	Mittel des Koeffizienten des osmot. Druckes der Larven des V. Lebensalters nach der Entblutung		0,839	

Tabelle II (Fortsetzung).

Fortlfde. Nr.	Alter	Tage	Δ	Unterschiede von der vorhergehend. Zahl
36	Unterschied zwischen dem Koeffizienten des osmot. Druckes der entbluteten Larve und dem Blute (35—34) (0,839—0,688)			+ 0,151
37	Mittel des Koeffizienten des osmot. Druckes des Blutes von während der Reinigung entbluteten Larven		0,562	
38	Mittel des Koeffizienten des osmot. Druckes von während der Reinigung entbluteten Larven		0,580	
39	Unterschied zwischen dem Koeffizienten des osmot. Druckes des Blutes und der während der Reinigung entbluteten Larven (38—37) (0,580—0,562)			+ 0,018
40	Mittel des Koeffizienten des osmot. Druckes der Larve bis zur Reinigung (3—11) . . .		0,904	
41	Unterschied zwischen dem Koeffizienten des osmot. Druckes der Reinigung und dem der früheren Stadien [12—(3—11)] (0,904—0,571)			+ 0,333
42	Unterschied zwischen dem Koeffizienten des osmot. Druckes während des Spinnens des Kokons und dem der früheren Stadien bis zur Reinigung [(3—11)—13] (0,904—0,623) .			+ 0,281
43	Untersehied zwischen dem Koeffizienten des osmot. Druckes der vollkommenen Raupe und dem der Larvenstadien (0,904—0,710) [(3—11)—17]			+ 0,203
44	Unterschied zwischen dem Koeffizienten des osmot. Druckes der ♀ und ♂ Puppe (0,749—0,671)			+ 0,078
45	Unterschied zwischen dem Koeffizienten des osmot. Druckes der entbluteten Puppe und dem der normalen Puppe (1,060—0,701) . .			+ 0,359
46	Unterschied zwischen dem Koeffizienten des osmot. Druckes des Schmetterlings und der Puppe (0,750—0,701)			+ 0,049
47	Unterschied zwischen dem Koeffizienten des osmot. Druckes beim Schmetterling vor und nach dem Legen der Eier (0,790—0,755) . .			+ 0,035
48	Unterschied zwischen dem Koeffizienten des osmot. Druckes des ♂ Schmetterlings vor der Begattung und nach der Begattung (0,730—0,728)			+ 0,002

Tabelle III.

Unterschiede beim Koeffizienten des osmotischen Druckes zwischen den verschiedenen Lebensaltern.

1. Unterschied zwischen dem II. und I. Lebensalter . . . . . — 0,294
2. „ „ „ III. „ II. „ . . . . . — 0,172
3. „ „ „ IV. „ III. „ . . . . . — 0,067
4. „ „ „ V. „ IV. „ . . . . . + 0,090
5. „ „ der Reinigung und dem V. Lebensalter — 0,225

Tabelle IV.

Unterschiede beim Koeffizienten des osmotischen Druckes zwischen den verschiedenen Schlafzeiten.

1.	Unterschied zwischen der II. und I. Schlafzeit	— 0,733
2.	" " " III. " II. "	— 0,002
3.	" " " IV. " III. "	— 0,049
4.	" " " Reinigung und der IV. Schlafzeit	— 0,125

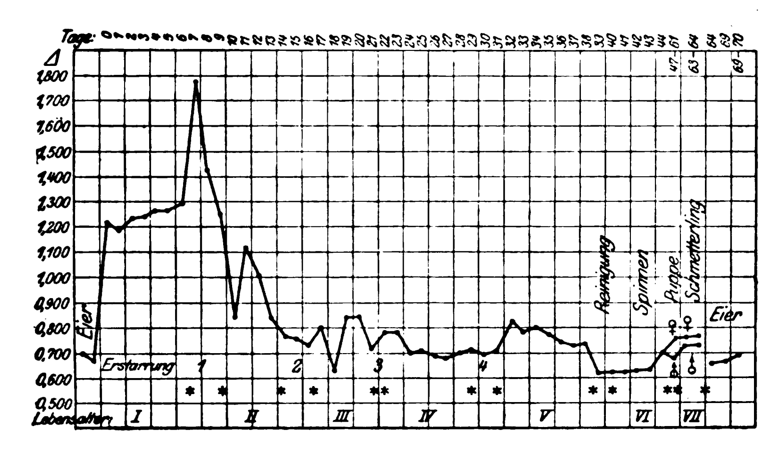


Fig. 1.

Fig. 1, welche die bezüglich des Koeffizienten des osmotischen Druckes während der Entwicklung von Bombyx mori L. erhaltenen Resultate darstellt (die römischen Ziffern bezeichnen die verschiedenen Lebensalter, die arabischen die verschiedenen Schlafzeiten).

Ein Blick auf die oben angeführten Tabellen wie auch auf die graphische Linie, auf der alle Resultate, die den Koeffizienten des osmotischen Druckes bei Bombyx mori in den verschiedenen Phasen seiner Entwicklung (Ei, Larve, Puppe, Schmetterling) betreffen, verzeichnet sind, läßt uns sofort den Verlauf dieser Entwicklung in ihrer Gesamtheit verstehen. Um jedoch ordnungsmäßig zu verfahren und uns eingehend über das Beobachtete Rechenschaft abzulegen, müssen wir die Art und Weise analysieren, wie sich der Koeffizient des osmotischen Druckes verhält nicht nur in seinem allgemeinen Verlauf, sondern auch während der einzelnen Entwicklungsperioden der Larve (Zustand des Wachens und des Schlafes in verschiedenen Lebensaltern, die letzte Periode der Existenz der Larve, in der ein erstes Stadium, in dem der Seidenwurm nach dem letzten Schlaf

gierig frißt, von einem zweiten, kürzeren, Reinigung oder Katharsis genannten Stadium zu unterscheiden ist, das dem Spinnen des Kokons vorausgeht, bei dem der Seidenwurm sich der Nahrung enthält und sein Darmrohr von den Nahrungsresten reinigt, an deren Stelle eine klare, helle Flüssigkeit tritt, und endlich das Spinnen des Kokons); wir müssen sehen, wie der Koeffizient sich verhält während der darauffolgenden Umwandlung in eine Raupe, in eine Puppe und bzw. in einen Schmetterling männlichen oder weiblichen Geschlechts, wie auch in den Eiern, sowohl sobald sie gelegt sind, als auch in der Periode des latenten Lebens im Winter und in der der Entwicklung der Larve vorausgehenden Periode. Wenn wir die erhaltenen verschiedenen Daten in Beziehung bringen zu den morphologischen und funktionellen Veränderungen, die in den verschiedenen Entwicklungsperioden eintreten, dann erst können wir uns über das, was wir beobachtet haben, vollständig Rechenschaft ablegen.

Der allgemeine Verlauf der aus den erhaltenen Resultaten konstruierten Figur läßt uns ersehen, daß im allgemeinen der Koeffizient des osmotischen Druckes in der Larve von Bombyx mori allmählich abnimmt in dem Maße, wie die Larve mehr heranwächst. Es sind jedoch einige Besonderheiten vorhanden, die wir hier hervorheben müssen, um uns viele Tatsachen zu erklären, die sonst unaufgeklärt bleiben würden.

Beobachtet man, wie sich der Koeffizient des osmotischen Druckes in den verschiedenen Lebensaltern verhält, so sieht man, daß er vom I. bis zum IV. Lebensalter nach und nach fortwährend abnimmt, wie auch in demselben Zeitraum die Unterschiede dieses Koeffizienten zwischen den beiden Lebensaltern allmählich immer kleiner werden.

Diese fortdauernde Abnahme ist meiner Ansicht nach durch zwei Arten von Erscheinungen zu erklären, nämlich durch die geringere Einfuhr von Nahrungsmitteln (Maulbeerblätter) in dem Maße, wie die Larve an Alter zunimmt (im Verhältnis zum Gewicht), und zweitens durch das verlangsamte Wachstum der Gewebe, während sie allmählich immer mehr heranwächst; diese beiden Faktoren ergänzen sich gegenseitig und üben gewiß einen ausgeprägten Einfluß auf den Koeffizienten des osmotischen Druckes aus.

Eine verhältnismäßig erhebliche Zunahme erfolgt während des V. Lebensalters, und diese Zunahme ist sicher bedingt durch

die enorme Entwicklung, welche die Seide bereitenden Drüsen in diesem Lebensalter allmählich erfahren, sowie durch die größere Gefräßigkeit der Larve. Dagegen beobachtet man eine sehr ausgeprägte Abnahme während der Reinigungsperiode im Vergleich mit dem V. Lebensalter, d. h. während der dem Spinnen des Kokons unmittelbar vorausgehenden Periode, und die Larve bleibt nicht nur vollständig nüchtern, sondern befreit sich auch von allen Exkrementstoffen, wie ich oben bereits erwähnte; diese beiden Faktoren bewirken gewiß miteinander die Abnahme dieses Koeffizienten während der ganzen Zeit der Reinigung. Eine leichte Zunahme erfolgt während der Zeit des Spinnens des Kokons, weil wegen der Atrophie, welcher die Seide bereitenden Drüsen allmählich anheimfallen, wegen des großen Wasserverlustes, der sowohl durch die Atmung als durch die Seide, die nun gesponnen wird, eintritt, die Gewebe der Larve notwendigerweise einen viel höheren Koeffizienten des osmotischen Druckes aufweisen.

Wie vorauszusehen war, erhielt sich der Gefrierpunkt des Blutes, wodurch die Beobachtungen anderer Autoren bei den verschiedenen Wirbellosen und Wirbeltieren bestätigt wurden, stets niedriger als der der ganzen entbluteten Larve (nämlich um 0,151).

Wie sich aus den Resultaten ergibt, entspricht der Gefrierpunkt der ganzen Larve genau dem arithmetischen Mittel dieser beiden Zahlen.

Charakteristisch ist auch der Einfluß der Ernährung auf den Gefrierpunkt der Larve; am 37. Tage zeigen seit 10 Stunden hungernde Larven den normal ernährten Larven gegenüber einen Unterschied nach der negativen Seite hin (Blut 0,040, entblutete Larven 0,080). Dies ist bedingt durch eine ausgebliebene Einfuhr von Wasser und Salzen bei der Ernährung (Maulbeerblätter).

Studiert man nun die Art und Weise, wie sich der Koeffizient des osmotischen Druckes während der Schlafperioden verhält, so sieht man, daß er im ersten Schlaf im Vergleich mit dem I. Lebensalter sehr zunimmt (0,241), sich während des zweiten Schlafes (0,747) und des dritten Schlafes (0,745) fast gleich erhält, um im letzten Schlafe (0,696) immer mehr abzunehmen. Betrachtet man die Tabelle der Unterschiede dieses Koeffizienten für die verschiedenen Schlafzeiten, so sieht man, daß dieser allmählich immer mehr abnimmt und für den zweiten

und ersten Schlaf ziemlich groß ist; geringer ist der Unterschied für die anderen Schlafzeiten. Man muß also annehmen, daß auch während der Schlafzeiten der Koeffizient des osmotischen Druckes dem abnehmenden Verlauf folgt, der während der ganzen Entwicklung der Larve beobachtet wird. Hier ist jedoch zu bemerken, daß der periodische Zustand latenten Lebens, in den die Larve von Bombyx mori eintritt, sicher von Veränderungen abhängig ist, die im osmotischen Druck eintreten. Addiert man nämlich die für diesen Koeffizienten während der Perioden des Wachens erhaltenen Zahlen, so erhält man 0,891, während wir, wenn wir die während der Perioden der Schlafzeiten erhaltenen Zahlen addieren, 0,917 erhalten. Mithin sind die Erscheinungen dieses latenten Lebens, dieser Verwandlung bei Bombyx mori durch eine größere Konzentration organischer Flüssigkeiten bedingt.

Zu erklären bleibt noch die enorme Zunahme (+ 0,241) des Koeffizienten des osmotischen Druckes im Vergleich mit dem des I. Lebensalters und (+ 0,535) im Vergleich mit dem des II. Lebensalters, die während des ersten Schlafes eintrat. Nach meiner Ansicht erklärt sich dies durch die großen histologischen Veränderungen, die bei der Larve während dieser ersten Verwandlung eintreten.

Vielleicht sind diese Veränderungen nicht so groß bei den folgenden Schlafzeiten oder Verwandlungen, und deshalb erhält sich bei den letzteren der Gefrierpunkt der Larve viel niedriger.

Es lassen sich auch ziemlich interessante Beobachtungen machen, wenn man zwischen verschiedenen Gruppen von Lebensaltern und latentem Leben während der ganzen Entwicklung der Larve Vergleiche anstellt. Es ergibt sich also aus diesen verschiedenen Mitteln, die zusammengestellt wurden, daß das Mittel des Gefrierpunktes (s. Tabelle II) im I. Lebensalter und im ersten Schlaf mit Einschluß auch des II. Lebensalters fast das Doppelte desjenigen vom zweiten Schlaf bis zur Zeit der Reinigung ist. Und dieser Unterschied nach Plus, der sich gerade in den ersten Entwicklungsperioden von Bombyx mori zeigt, ist sicher, wie ich schon oben andeutete, durch eine raschere Entwicklung der Gewebe zu erklären, die deshalb eine größere Einfuhr von Wasser, Salzen usw. im Vergleich mit dem, was in den folgenden Perioden im Verhältnis dazu eingeführt

wird, erfordert. Der Unterschied, der zwischen dem II. Lebensalter und dem I. Lebensalter und dem ersten Schlaf ziemlich groß ist (0,419), wird größer — nämlich 0,621 —, wenn man die Zahlen der beiden letzten Entwicklungsstadien mit den vom zweiten Schlaf bis zum letzten Lebensalter erhaltenen Resultaten vergleicht; dagegen ist er fast gleich (0,411), wenn man die Zahlen dieser letzten Gruppe von den bis zum ganzen II. Lebensalter erhaltenen subtrahiert.

Betrachten wir nun die Erscheinungen, die im osmotischen Druck der Larve während der Periode der Reinigung eintreten. Die Larve hört auf zu fressen und befreit sich von allen Exkrementstoffen, um sich auf das Spinnen des Kokons vorzubereiten. Die Seide erzeugenden Drüsen beginnen sich gleichzeitig genügend zu entwickeln. Diese Erscheinungen lassen uns leicht verstehen, daß der osmotische Druck während dieser Periode in großer Abnahme ist (0,333) im Vergleich mit den vorhergehenden Larvenstadien. Sie erklären uns auch, daß kein großer Unterschied (0,018) zwischen dem Gefrierpunkt des Blutes und der entbluteten Larve besteht im Vergleich mit dem (0,151), der in den vorhergehenden Larvenstadien vorhanden ist: kurz, das Fehlen des Faktors Ernährung verursacht diese Erscheinung.

Während des Spinnens des Kokons nimmt die Larve auch größere Umwandlungen vor: sie steigt, um das Spinnen vorzunehmen; gleichzeitig entwickeln sich die seidebereitenden Drüsen allmählich sehr aktiv und nehmen große Proportionen an. Dies erklärt uns, daß der Gefrierpunkt der Larve während dieser Periode höher ist als der bei der Reinigung vorhandene (+0,052), jedoch geringer als der während aller anderen Entwicklungsstadien der Larve vorhandene. Auch in diesem Falle ist es das Fehlen des Faktors Ernährung, das diese starke Abnahme verursacht; auch nicht die Entwicklung der seidebereiteten Drüsen und das Maximum der Tätigkeit, das sie während dieser Periode entfalten, kann dasjenige Maximum erreichen oder ihm wenigstens sehr nahekommen, das in den vorhergehenden Larvenstadien vorhanden ist.

Ich konnte auch die allmähliche Umwandlung der Larve zur Puppe sehr genau verfolgen; bei diesem Übergang ist der Koeffizient des osmotischen Druckes gleich 0,695, während im

Zustand einer vollkommenen, vollständigen Puppe eine viel höhere Ziffer, nämlich 0,701, sich ergibt (Unterschied nach plus gleich 0,106 im Vergleich mit dem ersten Übergangsstadium). Vergleicht man diese bei der Puppe erhaltenen Daten mit den anderen bei der Larve erhaltenen, so sieht man, daß der Gefrierpunkt von der Periode der Reinigung an bis zum Spinnen des Kokons, bis zur vollständigen Umwandlung der Larve in eine Puppe allmählich immer höher wird. Diese größere Zunahme von der Larve zur Puppe ist bedingt durch einen allmählichen Wasserverlust und durch die progressive Atrophie, der die Seide bereiteten Drüsen anheimfallen, sowie durch die größere Konzentration aller organischen Flüssigkeiten, insbesondere des Blutes — lauter Erscheinungen, die zu einem Zustand latenten Lebens führen, wie es eben der der Puppe ist.

Dieser Koeffizient des osmotischen Druckes scheint, wie sich klar aus der Tabelle I ergibt, allmählich zuzunehmen in dem Maße, wie die Puppe an Alter zunimmt; dies ist sicher durch den immer größeren Wasserverlust zu erklären, der nach und nach in diesen verschiedenen Stadien eintritt.

Ferner bemerkt man, daß die weiblichen Puppen einen höheren Koeffizienten des osmotischen Druckes (+ 0,078) zeigen als die männlichen Puppen, was gewiß mit der in den ersteren erfolgenden Bildung der Eier zusammenhängt.

Charakteristisch ist auch der Umstand, daß die aus einer entbluteten Larve stammende Puppe einen viel höheren Koeffizienten des osmotischen Druckes (Differenz 0,359) zeigt als eine aus einer normalen Larve stammenden Puppe: dies ist eben eine Folge des großen Mangels, insbesondere an Wasser, den die Larve zeigt, während sie sich nach und nach in eine Puppe umwandelt.

Was den bei den Schmetterlingen beobachteten erwähnten Koeffizienten betrifft (Mittel zwischen Männchen und Weibchen 0,750), so ist dieser viel größer als der bei der Puppe beobachtete (um 0,049): kurz, man bemerkt die fortdauernde Zunahme, auf die ich auch oben hingewiesen habe, die eben beginnt, sobald der Reinigungszustand zu Ende ist. Im Falle der Schmetterlinge ist diese Zunahme namentlich durch die enorme Entwicklung der Geschlechtsapparate bedingt. Daß sie davon abhängt, sieht man, wenn man die Zahlen vergleicht, die bei den männlichen und bei den weiblichen Schmetterlingen an-

geführt sind. Bei ersteren gelangt man zu einem Koeffizienten des osmotischen Druckes von 0,772, bei letzteren hingegen nur von 0,729 mit einem Unterschied nach plus für die weiblichen Schmetterlinge von 0,043. Er ist größer bei den weiblichen Schmetterlingen in Anbetracht eben der enormen Eiermenge, die sie enthalten, welche Menge viel größer ist als die in den anderen Schmetterlingen enthaltenen männlichen Elemente. Eine noch größere Zunahme beobachtet man nach der Begattung; dieser Unterschied ist viel größer bei den weiblichen (0,035) als bei den männlichen (0,002) Schmetterlingen. Dies ist dadurch zu erklären, daß das Weibchen sich nie vollständig aller seiner Eier entledigt, während das Männchen fast keine männlichen Elemente mehr enthält. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, daß der größere Koeffizient des osmotischen Druckes beim Weibchen eben durch die in ihm enthaltenen Eier bedingt ist. Und dann ist dieser Koeffizient ohne Zweifel stets größer in den Eiern als in den männlichen Elementen, daher auch der Unterschied.

Ich habe meine Aufmerksamkeit auch dem Gefrierpunkt der Eier von Bombyx mori in den verschiedenen Lebensaltern zugewandt. Sobald diese vom Schmetterling gelegt werden, wobei sie, wie bemerkt, eine charakteristische gelbliche Farbe zeigen, ist dieser 0,650; nach einigen (5 bis 6) Tagen nehmen sie eine graugelbe Farbe an und alsdann steigt der Gefrierpunkt auf 0,660, bis er, wenn die Färbung intensiv aschfarben ist, gleich 0,680 wird. Als die Eier während der ganzen Erstarrungsperiode untersucht wurden, d. h. seit der Legung (Juni) bis kurz vor dem Aufbrechen (April), erhielt sich dieser Gefrierpunkt fast konstant auf 0,690, während er in den Tagen, die dem Aufbrechen vorausgehen, 0,665 beträgt. Jedermann sieht, daß diese Schwankungen eine Folge der Schwankungen des Wassergehaltes sind; das Ei, sobald es gelegt ist, hat gewiß das Maximum des Wassergehaltes, den es dann allmählich verliert; der Verlust ist gewiß am größten im Zustande des latenten Lebens, während das Wasser wieder nach und nach absorbiert wird, während sich die Entstehung der Larve vorbereitet. Dies beweist also, wie wahr das ist, worauf ich schon in einer anderen Arbeit[1]) hingewiesen habe, nämlich daß der Zustand

[1]) O. Polimanti, Il letargo. Roma 1913.

latenten Lebens zuweilen durch den Wassergehalt verursacht wird und endlich daß das Wasser ein notwendiges Element ist, damit die Entstehung der Larve vor sich geht.

Nach den Resultaten, die U. Dutto[1]) bei der chemischen Analyse von Bombyx mori in den verschiedenen Entwicklungsstadien erhalten hat, müßte man annehmen, daß der Koeffizient des osmotischen Druckes von der Larve zur Puppe, zum Schmetterling wegen der proportionalen Zunahme des Fettgehaltes zunimmt. Die von Dutto erhaltenen Resultate sind die folgenden:

	Werte in % (Gramm)		
	Larve	Puppe	Schmetterling
Wasser	81,58	64,33	73,15
Asche	1,52	1,41	1,52
Fett	2,14	4,30	5,70

Wie man sieht, nimmt der Wassergehalt von der Larve zur Puppe ab, um im Schmetterling zuzunehmen; die Asche erhält sich fast gleich, während das Fett, wie ich schon oben sagte, in diesen drei Stadien fortwährend allmählich zunimmt. Ohne Zweifel bedarf Duttos Arbeit einer weiteren Kontrolle, weil er uns z. B. nicht sagt, wie viele männlichen und wie viele weiblichen Puppen er zu seinen Analysen verwendet hat. Wir können deshalb nicht wissen, inwieweit seine Resultate annehmbar sein können.

Dies ist ein erster Beitrag an Studien über die molekulare Konzentration der organischen Flüssigkeiten in den Insekten; diesem sollen weitere folgen, die darauf abzielen, biologische Fragen von der größten Bedeutung aufzuklären, nämlich zu untersuchen, ob die verschiedenen Umwandlungen, die das Insekt in seinem Lebenszyklus, dem periodischen Zustand des Wachens und der Erstarrung, dem Winterschlaf usw. erfährt, durch eine Schwankung des Koeffizienten des osmotischen Druckes bedingt sind.

[1]) U. Dutto, In L. Luciani: Comunicazioni al III Congresso Nazionale di Bacologia e Sericoltura (Cuneo 1895). Torino 1895, estratto p. 5—8.

Über den Nachweis des Benzols in Organen und seine Verteilung im Organismus.

Von

Georg Joachimoglu.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 16. März 1915.)

Mit 1 Figur im Text.

A. Heffter[1]) hat kürzlich einen Fall von Benzolvergiftung mitgeteilt, bei dem Zweifel bestanden, ob der Tod durch Benzol oder eine andere Ursache veranlaßt worden sei. Die Ablehnung des Benzols als Todesursache gründete sich namentlich darauf, daß in dem Leichenblut Benzol nicht nachgewiesen werden konnte. Auch bei zwei anderen von Heffter angeführten Vergiftungen, die Beinhauer und Buchmann berichtet haben, war die chemische Untersuchung des Blutes und verschiedener Organe (Lungen, Leber, Milz, Nieren) auf Benzol erfolglos verlaufen, so daß bisher überhaupt noch kein Fall von Benzolvergiftung beim Menschen bekannt geworden ist, in dem der Nachweis des Giftes in der Leiche erbracht worden wäre. Auch in Tierversuchen, hat man meines Wissens noch niemals unternommen, in den Organen unverändertes Benzol nachzuweisen.

Und während wir bei den meisten Giften Methoden besitzen, die auch die Auffindung kleiner Mengen in der Leiche ermöglichen, ist für das Benzol und seine Homologen kein sicheres Verfahren angegeben worden. Der obenerwähnte Fall zeigt, daß ein praktisches Bedürfnis für ein derartiges Verfahren vorliegt. Abgesehen davon, wäre dies auch für die theoretische Forschung wichtig und würde vielleicht manche Wirkungen des Benzols unserem Verständnis näherbringen.

---

[1]) A. Heffter, Über die akute Vergiftung durch Benzoldampf. Deutsche med. Wochenschr. **1915**, Nr. 7.

Nach welcher Methode der Chemiker in den angeführten Fällen versucht hat, das Benzol im Blut und im Harn nachzuweisen, ist nicht bekannt geworden. Falls er aber auf die für mit Wasserdämpfen flüchtigen Gifte übliche Weise versucht hat, das Benzol durch Destillation zu gewinnen, so wäre es ihm niemals möglich, zum Ziele zu kommen. Es wird in einem Lehrbuch der gerichtlichen Chemie[1]) kurz angegeben: „Zum Nachweis des Benzols (und seiner Homologen) trennt man das Destillat im Scheidetrichter vom Wasser“. Solche Vorschläge sind nicht ausführbar, weil das zu untersuchende Objekt, wie sich weiterhin zeigen wird, nicht so viel Benzol enthält, daß es sich im Destillat vom Wasser direkt abtrennt. Man muß berücksichtigen, daß Wasser imstande ist, verhältnismäßig erhebliche Mengen Benzol zu lösen. Wie groß diese Mengen sind, habe ich auf folgende Weise zu bestimmen versucht. Abgemessene Mengen Benzol (krist. frei von Thiophen, Kahlbaum) wurden in einer Stöpselflasche mit 1 Liter Wasser 6 Stunden lang bei Zimmertemperatur geschüttelt. Es zeigte sich, daß sich:

0,8 ccm C_6H_6 in 1000 ccm Wasser vollkommen lösten,
1,0 „ „ „ „ „ „ ebenfalls,
1,2 „ „ „ „ „ „ ebenfalls.
1,3 „ „ „ „ „ „ lösten sich nicht völlig.

Daraus geht hervor, daß gesättigtes Benzolwasser 1,2 ccm = 1,0596 g C_6H_6 im Liter enthält (spez. Gew. des Benzols 0,883). Toluol ist erheblich weniger löslich. 1 Liter gesättigtes Toluolwasser enthält 0,6 ccm = 0,4158 g Toluol. Es ist somit klar, daß man bei der Destillation aus benzolhaltigen Organen kein Benzol erhält, sondern im günstigsten Falle Benzolwasser, denn die Mengen, die in Frage kommen, sind viel geringer, als es der Löslichkeit des Benzols in Wasser entspricht. Die weitere Schwierigkeit ist, das Benzol in einem solchen Benzolwasser durch eine chemische Reaktion nachzuweisen. Der gegebene Weg für den Nachweis des Benzols ist seine Überführung in Dinitrobenzol, die aber in Gegenwart von Wasser nicht gelingt. Um das Benzol der wäßrigen Lösung

[1]) J. Gadamer, Lehrbuch der chemischen Toxikologie, Göttingen 1909, 345.

zu entziehen und in Dinitrobenzol überzuführen, stehen zwei Möglichkeiten zu Gebote:

A. Austreiben des Benzols durch Luft. Man leitet 10 bis 20 Stunden einen starken Luftstrom durch die wäßrige Lösung, der dann ein Zehnkugelrohr passiert, welches die Nitriersäure enthält. Das Benzol wird gleich in dem Zehnkugelrohr in Dinitrobenzol übergeführt. Man neutralisiert die Säure und schüttelt das Dinitrobenzol mit Äther aus.

Dieses Verfahren gibt bei größeren Mengen Benzol (0,2 bis 0,3 g) ganz brauchbare Resultate. Bei kleineren Mengen versagt es. Dies liegt zum Teil daran, daß man gezwungen ist, größere Mengen Säure anzuwenden. Man braucht mindestens 80—100 ccm Nitriersäure, die beim Neutralisieren entsprechend große Mengen Salze liefern. Die kleinen Mengen Dinitrobenzol können offenbar in Gegenwart so großer Mengen Salz mit Äther nicht extrahiert werden. Lehmann[1]) hat mit Hilfe dieses Verfahrens das Benzol in der Ein- und Ausatmungsluft bestimmt. Es kamen aber bei den Lehmannschen Untersuchungen größere Mengen Benzol in Betracht.

B. Ausschütteln mit einem Lösungsmittel, dessen Gegenwart der Nitrierung nicht hinderlich ist. Mit einem derartigen Lösungsmittel könnte man das Benzol aus dem Benzolwasser extrahieren und der Nitrierung unterwerfen. Halphen[2]) hat, um aus denaturiertem Spiritus das Benzol zu extrahieren, den Schwefelkohlenstoff angewandt. Das Benzol wurde dann in Gegenwart von Schwefelkohlenstoff nitriert, nach Verjagen des Schwefelkohlenstoffs das Nitroprodukt zu einem Amin reduziert und das Amin mit α-Naphthol nachgewiesen. Es werden leider in der Halphenschen Arbeit keine analytischen Resultate angegeben. Der Schwefelkohlenstoff hat sich bei meinen Versuchen nicht bewährt. Die mir zugänglichen Sorten (auch der reinste Schwefelkohlenstoff von Kahlbaum) enthielten, wenn auch in Spuren, Stoffe, die nitrierbar sind und eine Reaktion mit α-Naphthol geben. Ich habe deshalb den Schwefelkohlenstoff bald verlassen müssen. Es ist möglich, daß Halphen absolut chemisch reinen Schwefelkohlenstoff in Händen gehabt

[1]) K. B. Lehmann, Archiv f. Hygiene 72, 307, 1910.

[2]) M. G. Halphen: Recherches de la benzine dans les alcools régénérés". Journ. de Pharm. et de Chim. 11, 373, 1900.

hat. Aber schon wegen der leichten Zersetzlichkeit dieses Präparats ist es unbrauchbar. Ich habe statt dessen Tetrachlorkohlenstoff angewandt und habe damit ausgezeichnete Resultate bekommen.

Ohne näher auf die weiteren Vorversuche einzugehen, will ich gleich das Verfahren selbst schildern. Es beruht darauf, daß das Benzol bei saurer Reaktion aus dem Organbrei destilliert und in einer Vorlage, die Tetrachlorkohlenstoff enthält, aufgefangen wird. Es wird dann weiter in der Tetrachlorkohlenstofflösung nitriert. Das entstandene Dinitrobenzol wird aus der alkalisch gemachten Lösung mit Äther extrahiert und das nach dem Abdampfen des Äthers zurückbleibende Dinitrobenzol nach einer unten näher zu beschreibenden Reaktion identifiziert.

Methode der Isolierung. Die zerkleinerten Organe werden mit 100 bis 150 ccm Wasser angerührt und in einen 1-Liter-Rundkolben gebracht. Man setzt noch 12 ccm verdünnte Schwefelsäure zu. Auf den Rundkolben kommt ein 45 cm langer Destillationsaufsatz nach Glinsky[1]), dessen seitliches Ansatzrohr mit einem 60 cm langen Liebigschen Kühler verbunden ist. Der Kühler wird mit einer Stockschen Vorlage (250 ccm Inhalt) verbunden. Man bedient sich für sämtliche Verbindungen passender Korke von guter Qualität, die sorgfältig ausgebohrt sind. Der Destillationsaufsatz hat den Zweck, größere Mengen Wasser, die sonst bei der Destillation mit übergehen würden, zurückzuhalten. Das bei 80,4° siedende Benzol destilliert mit wenig Wasser über (40 bis 50 ccm). Nimmt man keinen Destillationsaufsatz, so bekommt man größere Mengen Wasser in die Vorlage, die die weitere Behandlung des Destillats erschweren. Die Vorlage enthält 80 ccm Tetrachlorkohlenstoff, die meistens genügen, damit die innere Öffnung in der Vorlage abgeschlossen ist. Zur Vermeidung von Verlusten wird sie noch mit einer Kältemischung gekühlt. Der Rundkolben wird auf einem Baboblech mit kleiner Flamme erhitzt. Nachdem die Flüssigkeit angefangen hat, ruhig zu kochen, setzt man die Destillation noch 20 Min. fort. Die beigefügte Figur 1 zeigt die Anordnung bei einer Destillation.

Der Inhalt der Vorlage wird nach beendeter Destillation in einen Scheidetrichter gebracht und die Tetrachlorkohlenstoff-

[1]) Glinsky, Journal der russischen chemischen Gesellschaft 6, 312. Zit. nach F. Beilstein, Handbuch der organischen Chemie 1, 34, 1893.

schicht vom Wasser getrennt. Man bringt sie in eine gut schließende dickwandige Stöpselflasche und setzt dazu 10 ccm Nitriersäure, die man durch Mischen von 2 Vol. rauchende Salpetersäure und 1 Vol. konz. Schwefelsäure erhält. Die Stöpselflasche wird 10 bis 15 Min. lang kräftig geschüttelt. Sodann bringt man den Inhalt in eine Porzellanschale und erhitzt auf dem Wasserbade, bis der CCl_4 vollständig verjagt ist. Es ist zweckmäßig, während dieser Zeit die Flüssigkeit mit einem Glasstab öfters umzurühren. Das zurückbleibende Säuregemisch, das das Benzol als Dinitrobenzol enthält, wird mit 100 ccm Wasser verdünnt. Man setzt dazu die entsprechende Menge

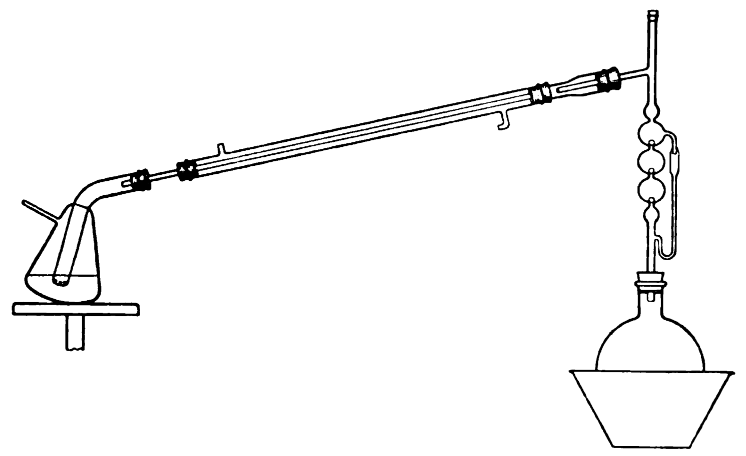


Fig. 1. Apparat für die Destillation des Benzols.

Natronlauge und stellt schwach alkalische Reaktion her. Die alkalische Flüssigkeit wird in einem Scheidetrichter dreimal mit je 80 ccm Äther geschüttelt. Der Äther wird abgetrennt und in einem Scheidetrichter 3 bis 5 Stunden stehen gelassen. Auf diese Weise scheiden sich die geringen Mengen Wasser, die der Äther enthält, an den Wandungen des Trichters ab. Das Dinitrobenzol kann man auch aus schwachsaurer Lösung mit Äther extrahieren. Für qualitative Untersuchungen ist es unerheblich, ob man aus alkalischer Lösung oder saurer extrahiert. Dagegen ist für die quantitative Bestimmung des Benzols das Ausschütteln aus alkalischer Lösung vorzuziehen.

Der Äther wird bis auf 30 bis 40 ccm abdestilliert und der Rest, falls es sich um eine quantitative Untersuchung

handelt, aus einer gewogenen Glasschale vorsichtig abgedampft. Falls die Organe Benzol enthielten, so erhält man einen gelb gefärbten, zum Teil krystallinischen Rückstand. Daß der Rückstand Dinitrobenzol ist, wird am einfachsten nach einer Reaktion festgestellt, die Chavassieu und Morel[1]) angegeben haben. Diese Forscher geben an, daß verschiedene Zuckerarten mit m-Dinitrobenzol charakteristische Färbungen geben. Sie haben diese Reaktion empfohlen, um reduzierende Zuckerarten nebeneinander nachzuweisen. Umgekehrt kann man natürlich die Reaktion benutzen, um mit Hilfe eines solchen Zuckers m-Dinitrobenzol als solches zu identifizieren. Bei der Nitrierung des Benzols entsteht bekanntermaßen hauptsächlich m-Dinitrobenzol neben wenig o- und p-Dinitrobenzol. Es ist nun eigentümlich, daß m- und o-Dinitrobenzol in alkoholischer Lösung bei alkalischer Reaktion mit Lävulose eine intensive Violettfärbung geben, während dies bei p-Dinitrobenzol nicht der Fall ist.

Ausführung der Reaktion. Man löst 3 bis 5 mg des erhaltenen Rückstandes in 1,5 ccm absol. Alkohol und setzt dazu 2 bis 3 Tropfen 33 $^0/_0$ige Natronlauge. Nachdem eine vollkommene Lösung des Dinitrobenzols erfolgt ist, setzt man zu diesem Gemisch das doppelte Volumen 1 $^0/_0$iger Lävuloselösung zu. Es vergehen 1 bis 2 Minuten, und dann tritt eine reine intensive Violettfärbung der ganzen Flüssigkeit ein. Diese Violettfärbung ist nicht lange haltbar, sie nimmt nach 5 bis 10 Minuten einen schmutzigbraunen Ton an. Mit Hilfe dieser Reaktion, die ich weiter als Lävulosereaktion bezeichnen will, ist man imstande, 0,5 mg m-Dinitrobenzol bequem nachzuweisen. Die Lävulosereaktion ist für m- und o-Dinitrobenzol charakteristisch. Andere Nitroverbindungen, wie z. B. o- und p-Nitrophenol, Dinitrophenol, m-Nitrobenzoesäure, o- und p-Nitrotoluol, 1, 2, 4 Dinitrotoluol, o-Nitranilin und Nitrotoluidin geben mit Lävulose keine derartige Färbung wie das m-Dinitrobenzol. Halphen[2]) hat das Dinitrobenzol, wie ich oben kurz erwähnt habe, auf andere Weise zu identifizieren versucht. Die Reaktion, die er beschreibt, ist folgende: Man löst den Rückstand in verdünnter

---

[1]) Chavassieu et Morel, Sur une réaction colorée des sucres reducteurs donnée par le m-dinitrobenzène en milieu alcalin. Comptes rendus de l'Académie des sciences **143**, 966, 1906.

[2]) A. a. O.

Salzsäure (9 %), setzt dazu 4 bis 5 g Zinkstaub und 1 Tropfen Platinchloridlösung. Nachdem der naszierende Wasserstoff 8 bis 10 Minuten auf das Dinitrobenzol eingewirkt hat, filtriert man die Flüssigkeit und diazotiert das entstandene Diamin durch ein paar Tropfen 10 %iger Natriumnitritlösung, sodann setzt man Soda zu, bis ein geringer Teil des in Lösung gegangenen Zinks durch das Carbonat ausgefällt ist. Zu dieser alkalischen Flüssigkeit setzt man 3 bis 4 ccm 0,1 %ige alkalische α-Naphthollösung. Man erhält eine intensive rotbraune Färbung. Diese Reaktion ist viel empfindlicher als die Lävulosereaktion, denn sie tritt noch bei einer Verdünnung von 1 : 100000 Dinitrobenzol deutlich auf. Sie ist allerdings nicht so charakteristisch wie die Lävulosereaktion, denn Nitrokörper, die unter diesen Versuchsbedingen zu einem Amin reduzierbar und durch Natriumnitrit diazotierbar sind, würden ebenfalls eine Färbung mit α-Naphthollösung geben. Ich habe deshalb bei meinen Versuchen immer die Lävulosereaktion für beweisender angesehen.

Nach dem beschriebenen Verfahren der Isolierung des Benzols aus den Organen und seines Nachweises mit Hilfe der Lävulosereaktion gelingt es, bis 5 mg Benzol in Leber, Gehirn oder Blut nachzuweisen. Kontrollversuche, bei denen ich den Organen kein Benzol zusetzte, ergaben keinen Rückstand. Somit läßt dieses Verfahren in qualitativer Beziehung nichts zu wünschen übrig.

Ich habe noch die Frage geprüft, ob andere Gifte, die in den Organen vorhanden sein könnten, die Reaktion stören oder sie unmöglich machen. Es ist klar, daß, falls in den Organen Nitrobenzol vorhanden ist, man eine positive Reaktion bekommen wird. Man hat aber für die Nitrobenzolvergiftung, abgesehen von dem charakteristischen Geruch, den man bei der Sektion immer wahrnimmt, noch andere charakteristische Kennzeichen, auf die ich nicht näher eingehen will. Ebenso verhält sich die Carbolsäure. Sie wird bei dieser Behandlung zu Pikrinsäure nitriert, und es ist dann fast unmöglich, bei den kleinen Mengen von Dinitrobenzol die Pikrinsäure zu entfernen. Diese zwei Stoffe würden also in praxi die Ausführung des Benzolnachweises stören. Dagegen stört das Vorhandensein von Blausäure oder Chloroform, die ebenfalls mit Wasserdämpfen flüchtig sind, in keiner Weise die Auffindung des Benzols.

Was leistet die Methode quantitativ?

Es liegt auf der Hand, daß man durch Wägen des erhaltenen Dinitrobenzols die Menge Benzol bestimmen kann. Leider sind die Resultate in quantitativer Beziehung nicht so befriedigend gewesen wie in qualitativer. Ich habe tierischen Organen abgemessene Mengen Benzolwasser zugesetzt und habe dann durch Wägen des erhaltenen Rückstandes die Menge Benzol zu bestimmen versucht. Ich will von diesen Versuchen 3 in folgender Tabelle zusammenstellen.

Tabelle I.
Quantative Versuche.

	Ber. C_6H_6 mg	Gef. mg	Ausbeute %
60 g Leber + 10 ccm Benzolwasser	10,590	5,95	56,2
60 g Schweinehirn + 50 ccm Benzolwasser	33,39	20,84	62,4
60 g Leber + 50 ccm Benzolwasser	33,39	19,9	59,6

Man bekommt also etwa 55 bis 60 % des zugesetzten Benzols wieder. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich zum Teil daran, daß, abgesehen von kleinen Verlusten, die bei der Destillation immer möglich sind, der Tetrachlorkohlenstoff nicht alles Benzol aus dem Wasser, das bei der Destillation mit übergeht, extrahiert. Ein ganz geringer Teil bleibt wohl im Wasser zurück. Ich will noch erwähnen, daß ich für die quantitativen Versuche das Benzolwasser in der Weise herstellte, daß ich in einem Kügelchen ganz reines Benzol „zur Analyse“ Kahlbaum abwog, in 1 Liter Wasser das Kügelchen zerbrach und das Benzol durch Schütteln in Lösung brachte.

Tierversuche.

Ich habe weiter einige Tierversuche gemacht, um zu sehen, ob das Benzol in den Organen von Tieren, die mit Benzol vergiftet sind, nachweisbar ist. Zunächst 3 Versuche an Katzen. Die Tiere wurden in eine 15 Liter fassende Glasglocke gesetzt, durch die ein Luftstrom geleitet wurde. Die Luft passierte eine Waschflasche, die Benzol enthielt. Eine Gasuhr erlaubte zu jeder Zeit, die Menge Luft, die durch die Glocke ging, zu bestimmen. Die Waschflasche wurde vor und nach dem Versuch gewogen, und wenn man die Menge Benzol, die aus

der Waschflasche verdunstet, mit der Anzahl Liter Luft, die die Glocke passierten, dividiert, so hat man einen Anhaltspunkt für die Konzentration des Benzoldampfes in der Glocke. Ich gebe gleich die Protokolle wieder.

26. I. 1915, Katze 1.

Gew. 2780 g. 60 mg Benzol in 1 Liter Luft.
9^{05} Beginn der Inhalation.
9^{50} Tier ist unruhig.
10^{00} Fibrillare Zuckungen, Tier legt sich auf die Seite.
10^{15} Heftige allgemeine Krämpfe.
10^{20} Erbrechen.
10^{30} Atmung steht still.
10^{35} Tot.

Sektion gleich nach dem Tode.

Lungen emphysematös gebläht.
Peristaltische Contraction des Oesophagus!
Magen, Darm o. B.
Blut von dunkler Farbe. Keine Gerinnsel, weder im Herzen noch in den großen Gefäßen.
Gehirn o. B.

Auf Benzol wurden untersucht Leber, Blut und Gehirn.

Leber, 70 g.	Gefunden:	42,0 mg	Dinitrobenzol	= 19,5 mg	Benzol
Gehirn, 14 g.	"	20,2 "	"	= 9,3 "	"
Blut, 105 g.	"	26,0 "	"	= 12,0 "	"

Die Untersuchung wurde gleich nach der Sektion vorgenommen.

28. I. 1915. Katze 2.

Gew. 2800 g. 55,5 mg C_6H_6 in 1 l Luft.
10^{45} Beginn der Inhalation.
10^{55} Krämpfe, Tier legt sich auf die Seite.
11^{00} Zuckungen in den Muskeln der Extremitäten, die blitzartig auftreten.
11^{10} Atmung verlangsamt, unregelmäßig.
11^{25} Starke allgemeine Krämpfe.
11^{34} Tot.
Die Sektion sowie auch die Untersuchung der Organe auf Benzol wurde erst am nächsten Tag vorgenommen.

Sektion.

Beide Lungen hyperämisch, namentlich in den unteren Lappen. Schleimhaut der Trachea und der Bronchien mäßig gerötet.

Magen o. B. Einzelne punktförmige Blutungen in der Schleimhaut des Dünndarms. Blut dunkelrot. Leber, Nieren o. B. Auf Benzol wurden untersucht: Leber und Gehirn, außerdem wurde das Fettgewebe aus der Umgebung der Nieren, des Herzens und das Unterhautfettgewebe herauspräpariert und ebenfalls auf Benzol untersucht.

Leber, 77 g.	Gefunden:	42 mg	Dinitrobenzol	= 19,5 mg	Benzol
Gehirn, 14 g.	"	24 "	"	= 11,1 "	"
Fettgewebe, 300 g.	"	10 "	"	= 4,6 "	"

17. II. 1915. Versuch mit **Katze** 3, Gew. 2730 g, verlief, was den Symptomenkomplex der Vergiftung und den Sektionsbefund betrifft, ähnlich. Ich will deshalb von einer Wiedergabe des Protokolls absehen.

Auf Benzol wurden untersucht:

Leber, 83 g.	Gefunden:	41 mg	Dinitrobenzol	= 19,5 mg Benzol
Gehirn, 16 g.	„	22 „	„	= 10,1 „ „
Blut, 33 g.	„	9,3 „	„	= 4,3 „ „

Milz, 8 g. Keine nachweisbaren Mengen.

Es wurde weiter ein Hund durch Inhalation vergiftet.

Von einer Bestimmung der Benzolkonzentration in der Luft wurde in diesem Versuch aus äußeren Umständen abgesehen. Das Tier kam in einen Kasten, in dem ich Benzol von einer großen Fläche Filtrierpapier verdunsten ließ.

1. III. 1915. Hund, Gew. 10050 g.

10^{00} Beginn der Inhalation.

10^{10} Speichel aus dem Maul. Conjunctiven gerötet. Tier taumelt.

10^{20} Tier legt sich auf die Seite.

10^{25} Blitzartiges Muskelzucken fast am ganzen Körper. Fibrilläre Zuckungen.

12^{30} Tot.

Sektion.

Blut dunkelrot. In den Gefäßen überall flüssiges Blut, im Herzen einige Gerinnsel. Schleimhaut der Trachea mäßig gerötet. Das Lungengewebe blutreich. Kein Ödem. Das Gewebe überall lufthaltig.

Leber, Milz o. B.

Nieren, beide hyperämisch.

Die Schleimhaut der Pars pylorica des Magens, sowie auch die Schleimhaut des Duodenums ist gerötet. Am oberen Teil des Duodenums einige hirsekorngroße Blutungen in der Schleimhaut.

Auf Benzol wurden untersucht Blut, Gehirn, Rückenmark, Leber, beide Nieren und die Milz zusammen.

Leber, 375 g.	Gef.:	102,0 mg	Dinitrobenzol	= 47,2 mg Benzol
Gehirn, 71,5 g.	„	28,6 „	„	= 13,2 „ „
Blut, 222 g.	„	31,6 „	„	= 14,6 „ „

Beide Nieren, 57 g + Milz, 26 g. Keine nachweisbaren Mengen.

Rückenmark, 18 g. Gef.: 10,6 mg Dinitrobenzol = 4,9 mg Benzol

23. II. 1915. Benzol per os.

Kaninchen, Gew. 2110 g.

2^{25} 15 ccm C_6H_6 mit der Schlundsonde in den Magen gebracht.

2^{40} Tier liegt mit gestreckten hinteren Extremitäten.

2^{45} Wirft sich umher, beschleunigte Atmung.

3^{00} Muskelzuckungen am ganzen Körper.

3^{55} Exspirationsluft riecht deutlich nach Benzol.

10^{00} Tot.

Sektion.

Schleimhaut der Trachea hochgradig gerötet. Lungen hyperämisch. Herz, Ventrikel und Vorhöfe enthalten Cruorgerinnsel, Muskulatur schlaff. Mageninhalt riecht deutlich nach Benzol. An der Pars pylorica ist die Schleimhaut ulceriert. Zahlreiche Blutungen. Darm hyperämisch. Nieren, Gehirn o. B.

Auf Benzol wurden untersucht: Leber, Gehirn und Lungen.

Leber, 56 g. Gefunden: 16,0 mg Dinitrobenzol = 7,4 mg Benzol
Gehirn, 15,5 g. " 8,4 " " = 3,9 " "
Lungen, 8 g. Keine nachweisbaren Mengen.

In folgender Tabelle habe ich die Zahlen für je 100 g Gewebe der untersuchten Organe zusammengestellt.

Tabelle II.

	Katze 1 mg	Katze 2 mg	Katze 3 mg	Kaninchen (per os) mg	Hund mg
Benzol in:					
100 g Leber . . .	27,8	25,3	23,1	13,2	12,6
100 g Gehirn . .	66,8	79,2	63,9	31,1	18,5
100 g Blut . . .	11,4	nicht untersucht	18,0	nicht untersucht	6,6
100 g Rückenmark	nicht untersucht	do.	nicht untersucht	do.	27,3
100 g Fettgewebe	do.	1,5	do.	do.	nicht untersucht
100 g Milz	do.	nicht untersucht	nicht nachweisbar	do.	+ Nieren n. nachweisb.
100 g Lunge . . .	do.	do.	nicht untersucht	nicht nachweisbar	nicht untersucht

Die Zahlen der Tabelle II machen natürlich auf absolute Richtigkeit keinen Anspruch, vielmehr muß man aus den obenerwähnten Gründen annehmen, daß in den Organen tatsächlich mehr Benzol enthalten ist. Die Tabelle ergibt aber eine andere sehr interessante Tatsache. Vergleicht man die Benzolmengen, die in gleichen Gewichtsmengen der Organe dieser Tiere vorhanden waren, so sieht man, daß die Werte für das Gehirn und Rückenmark größer sind als für die übrigen Organe. Es ergibt sich daraus, daß das Benzol zu den Lipoiden des Gehirns und Rückenmarks eine stärkere Affinität besitzt, als zu den Bestandteilen der übrigen Organe. Auf diesen Umstand hat Heffter[1]) auf Grund theoretischer Erwägungen besonders hin-

[1]) A. a. O.

gewiesen und geraten, bei Benzolvergiftungen, falls man einen Benzolnachweis führen will, das Gehirn besonders zu untersuchen. Diese auf Grund theoretischer Erwägungen gemachte Überlegung findet hiermit ihre experimentelle Bestätigung.

Die besondere Affinität gewisser narkotisch wirkender Stoffe zu den Geweben des Zentralnervensystems ist schon vielfach beobachtet worden. Ich erinnere an die bekannten Untersuchungen von Nicloux[1]) über das Chloroform und die von Archangelsky[2]) über Aceton und Chloralhydrat.

Zum Schluß will ich noch erwähnen, daß nach dem beschriebenen Verfahren auch der Nachweis des Toluols im Toluolwasser gelingt.

50 ccm Toluolwasser = 20,8 mg Toluol wurden 3mal mit je 30 ccm Tetrachlorkohlenstoff geschüttelt und weiter wie bei Benzol behandelt. Nach Verjagen des Äthers erhält man einen gelblich-weißen Rückstand, der aus glänzenden Nadeln besteht. In alkoholischer Lösung gibt der Rückstand mit Natronlauge versetzt eine blaue Färbung, die für 2-, 4-Dinitrotoluol charakteristisch ist[3]). Aus Alkohol umkrystallisiert schmilzt das Produkt scharf bei 74°. Schmelzpunkt des reinen 2-, 4-Dinitrotoluols gleich 70°. Man muß auch hier berücksichtigen, daß beim Nitrieren des Toluols neben 2-, 4-Dinitrotoluol auch 2-, 5-Dinitrotoluol und 2-, 4-, 6-Trinitrotoluol entsteht[4]).

Tierversuche mit Toluol wurden nicht ausgeführt. Das Toluol spielt ja auch praktisch eine viel geringere Rolle als das Benzol, und auch theoretisch wären ähnliche Befunde zu erwarten wie beim Benzol.

Zusammenfassung.

Es wird ein Verfahren beschrieben, um Benzol bei Benzolvergiftungen in den Organen der Leiche qualitativ und quantitativ nachzuweisen.

Bei Benzolvergiftungen enthält das Gehirn und Rückenmark relativ mehr Benzol als die übrigen Organe.

---

[1]) M. Nicloux, Les anesthésiques généraux. Paris 1908.

[2]) C. Archangelsky, Über die Verteilung des Chloralhydrats und Acetons im Organismus. Arch. f. experiment. Pathol. u. Pharmakol. **46**, 347, 1901.

[3]) G. Schultz, Über einige Bestandteile des Steinkohlenteers. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **42**, 3602, 1909.

[4]) Richter, Organische Chemie **2**, 75, 1913.

Hemmung der Indolbildung bei Bact. coli in Kulturen mit Zuckerzusatz.

Von

Albert Fischer.

(Aus dem Universitätsinstitut für allgemeine Pathologie, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 24. März 1915.)

Mit 2 Figuren im Text.

Als ich gelegentlich einige vergleichende Untersuchungen über Salkowskis Nitrosoindolreaktion und die Ehrlichsche Dimethylamidobenzaldehydreaktion auf Colikulturen anstellte, und gleichzeitig die betreffende Ausführung dieser Reaktion in der Literatur suchte, fand ich an mehreren Stellen die Angabe, daß die Reaktion den besten Erfolg in Kulturen hätte, die keinen Zucker enthielten (Seelig, Fermi). Es erregte deswegen bei mir nicht wenig Interesse, und ich beschloß dann, zu untersuchen, warum wohl der Bact coli bei Gegenwart von Zucker kein Indol produzierte.

Bei der Durchsicht der Literatur über den speziellen Einfluß auf die Bildung solcher Fäulnisprodukte fand ich, daß Hirschler schon eine ganze Reihe von Untersuchungen über die Einwirkung einiger Zuckerarten auf die Fäulnis des Fleisches ausgeführt hatte. Er fand z. B., daß Rohrzucker, Dextrin, Stärke und Glycerin die Bildung einer Reihe aromatischer Fäulnisprodukte verhindern konnte. Über die Ursache des Ausbleibens dieser Stoffe nimmt der Verfasser an, daß sie entweder 1. an der bildenden Milchsäure liegen könne, oder daß 2. das Vorhandensein von Zucker bewirke, daß die Bakterien zum großen Teil ihren Energieverbrauch davon decken könnten und die Proteinstoffe so wenig wie nur möglich anzugreifen suchen, oder 3. daß durch die Gärung der Kohlenhydrate ein höheres Glied in der Reihe der Fettsäuren entstehen und in-

folge derselben hemmend auf die Fäulnis einwirken könnte. Der Verfasser hat in derselben Arbeit über einige Versuche berichtet, die darauf ausgingen, die Fäulnis im Darmkanal dadurch zu hemmen, daß er außer angeführten Zuckerarten per os auch reichliche Mengen Fleisch zuführte. Hirschler meinte denn auch eine bedeutende Herabsetzung der Menge der aromatischen Stoffe wahrnehmen zu können.

Fischer hatte geraume Zeit zuvor die Beobachtung gemacht, daß sich die Hydroceleflüssigkeit längere Zeit hindurch halten konnte, wenn er eine konzentrierte Zuckerlösung zusetzte.

Später hat Kuhn, dessen Interesse durch Hirschlers Arbeit angeregt wurde, auch gezeigt, daß das Bact. vulgare die Proteinstoffe nicht in so hohem Grade spaltete, wenn sich Traubenzucker in der Kultur fand. Schmitz hat eine Reihe von Fütterungsversuchen ausgeführt, die darauf ausgingen, die Fäulnis im Darm dadurch herabzusetzen, daß er Käse aus Milch und Kefir dem Fleisch hinzufügte. Der Verfasser meint die größte Hemmung der Fäulnis da zu beobachten, wo die Eingabe der Caseinmenge in Hinblick auf den Zuckergehalt am größten sei und umgekehrt, und endlich wird der geringen Menge Milchsäure, die sich in frischem Käse findet, ein Teil der hemmenden Wirkung zugeschrieben. Der Verfasser äußert in einer andern Arbeit (Schmitz), daß die Salzsäure des Magens einen großen hemmenden Einfluß auf die Fäulnis habe.

Auerbach fand, daß peptonisierende Bakterien die Gelatine nicht immer flüssig machten, und beobachtete, daß der Gehalt des Nährsubstrats an Zucker das Entscheidende war. Er zeigte weiter, daß bei Zusatz von Glucose und Lactose zur Gelatine die Peptonisierung ganz ausblieb. Von diesen beiden Kohlenhydraten wirkte der Traubenzucker am kräftigsten. Lehmann meinte dann, daß die gebildete Säure die Wirkung des Bakterientrypsins vernichtete. Daß die Säure nicht die Ursache war, zeigte Auerbach dadurch, daß er die gebildete Säure während der Entwicklung neutralisierte, und konstatierte, daß die Peptonisierung trotzdem ausblieb. Als letzte Frage war nun zu entscheiden, ob das Trypsin überhaupt in zuckerhaltigem Nährmaterial zur Entwicklung käme. Der Verfasser meint zu dem Resultat zu kommen, daß das proteolytische Ferment nicht zur Entwicklung komme, wenn Zucker vorhanden ist.

Bei den nachstehenden Untersuchungen haben wir als Nährmaterial für Bact. coli ein 2 %iges Peptonwasser angewandt (Witte), dem die betreffende Zuckerart zugesetzt wurde. Die Gesamtmenge, Peptonwasser + Zuckerlösung, betrug immer 10 ccm. Und die Indolreaktion, die mit diesen 10 ccm angestellt wurde, ging ad modum Ehrlich (Pröscher) mit Dimethylamidobenzaldehyd vor sich. Bei Benutzung von Autenrieth-Koenigsbergers Colorimeter konnte man recht gut die verschiedenen Stärken der Farbe unterscheiden und dadurch Aufschlüsse über die relativen Indolmengen erhalten.

Anfangs machten wir 5 %ige Lösungen der verschiedenen Zuckerarten und setzten von diesen einer Reihe Kulturen steigende Mengen hinzu. Sehr schnell aber gingen wir des Vergleichs halber dazu über, mit molaren Lösungen zu arbeiten; wir benutzten als passende Konzentration $^1/_4$ mol. Lösungen, d. h. es wurden für die Monosaccharide 4,5 % und für die Disaccharide 8,5 % angewandt. Die Versuche sind derartig angestellt, daß wir während der ganzen Arbeit dieselben Zuckerkonzentrationen behalten konnten. Eine Versuchsreihe umfaßte 9 Gläser, denen verschiedene Mengen einer $^1/_4$ mol. Zuckerlösung zugesetzt wurden.

Berechnen wir, welche Zuckerkonzentration in pro mille die betreffende Kultur bekommt. Wenn es Monosaccharide sind, so ergibt sich folgendes:

Nr. 1: 0,00 ‰	Nr. 4: 1,35 ‰	Nr. 7: 3,60 ‰
„ 2: 0,45 ‰	„ 5: 1,80 ‰	„ 8: 4,50 ‰
„ 3: 0,90 ‰	„ 6: 2,25 ‰	„ 9: 9,00 ‰

Wir sehen, daß die größte Konzentration, von der hier die Rede ist, sich in Glas Nr. 9 findet, wo sie noch nicht 1 % beträgt.

Die Gläser wurden bei 120° sterilisiert und mit einer 24 Stunden alten Agarkultur von Bact. coli geimpft. Im Thermostat, der auf ca. 37° gehalten wurde, blieben die Kulturen ca. 43 Stunden.

Glucose, Galaktose, Fructose, Lactose und Maltose sind die Zuckerarten, die im folgenden benutzt wurden.

Setzen wir demnach einer Reihe Lösungen nachstehender Tabelle in steigenden Konzentrationen Lactose zu und führen die Indolreaktion nach 43 Stunden aus, so zeigt es sich, daß wir

eine sehr kräftige positive Indolreaktion in allen Gläsern bekommen (Tabelle I). Setzen wir dagegen Glucose zu, so bekommen wir in den 5 ersten Gläsern eine positive Reaktion, und in den 4 letzten eine negative (Tabelle II). Dieser Versuch ließe sich beliebig viele Male wiederholen: das Ausbleiben der Indolreaktion zeigte sich immer an derselben Stelle der Reihe. Es war nun wichtig, zu untersuchen, ob sich andere Colistämme ebenso verhielten. Von 11 Colistämmen höchst verschiedenen Ursprungs, sie waren z. B. aus dem normalen Darm, Cystiten, Nephriten usw. isoliert, zeigten 9 eine absolute Hemmung, die genau an derselben Stelle lag, während 2 derselben in der Indolproduktion bei einer niederen Zuckerkonzentration gehemmt wurden, nämlich in Glas Nr. 5.

Tabelle I.

Nr.	$^1/_4$ mol. Lactose ccm	2 $^0/_0$ iges Peptonwasser ccm	Colorimeter
1	0,0	10,0	14
2	0,1	9,9	25
3	0,2	9,8	32
4	0,3	9,7	34
5	0,4	9,6	39
6	0,5	9,5	42
7	0,8	9,2	42
8	1,0	9,0	46
9	2,0	8,0	50

Tabelle II.

Nr.	$^1/_4$ mol. Glucose ccm	2 $^0/_0$ iges Peptonwasser ccm	Colorimeter
1	0,0	10,0	6
2	0,1	9,9	12
3	0,2	9,8	16
4	0,3	9,7	22
5	0,4	9,6	25
6	0,5	9,5	100[1])
7	0,8	9,2	100
8	1,0	9,0	100
9	2,0	8,0	100

Galaktose, Fructose und Maltose verhalten sich ungefähr gleich, indem sie die Indolproduktion innerhalb der gewählten

[1]) Absolute Hemmung.

Konzentrationen (Tabellen III, IV und V) nicht hemmen. Fructose kommt jedoch der vollständigen Hemmung am nächsten. Die Indolreaktion war indessen in Glas Nr. 9 sehr schwach.

Tabelle III.

Nr.	1/4 mol. Galaktose ccm	2%iges Peptonwasser ccm	Colorimeter
1	0,0	10,0	11
2	0,1	9,9	10
3	0,2	9,8	17
4	0,3	9,7	22
5	0,4	9,6	27
6	0,5	9,5	40
7	0,8	9,2	40
8	1,0	9,0	45
9	2,0	8,0	53

Tabelle IV.

Nr.	1/4 mol. Fructose ccm	2%iges Peptonwasser ccm	Colorimeter
1	0,0	10,0	0
2	0,1	9,9	10
3	0,2	9,8	20
4	0,3	9,7	27
5	0,4	9,6	32
6	0,5	9,5	46
7	0,8	9,2	64
8	1,0	9,0	69
9	2,0	8,0	80

Tabelle V.

Nr.	1/4 mol. Maltose ccm	2%iges Peptonwasser ccm	Colorimeter
1	0,0	10,0	6
2	0,1	9,9	21
3	0,2	9,8	25
4	0,3	9,7	31
5	0,4	9,6	33
6	0,5	9,5	44
7	0,8	9,2	33
8	1,0	9,0	33
9	2,0	8,0	37

Hieraus scheint deutlich hervorzugehen, daß Glucose vor den anderen der geprüften Zuckerarten im Besitze der recht eigentümlichen Eigenschaft sei, in den gewählten Konzentrations-

intervallen die Indolproduktion beim Bact. coli absolut zu hemmen. Noch auffälliger und bemerkenswerter aber ist der sehr schroffe Übergang zwischen dem letzten Glas, wo sich noch positive Indolreaktion findet, und dem ersten Hemmungsglas. Woran dieser plötzlich eintretende Unterschied liegt, läßt sich im voraus wohl nicht sagen. Man weiß nämlich nicht a priori, ob die Hemmung entweder von schlechten Lebensbedingungen für die Bakterien herrührt, oder ob sich vielleicht Stoffe gebildet haben, die den positiven Ausfall der Indolreaktion hindern, d. h. die geradezu das Eintreten der chemischen Reaktion zwischen dem vielleicht trotzdem vorhandenen Indol und Ehrlichs Reagens beeinflussen.

Die Hemmung des Wachstums der Bakterien könnte, wie es schon eine Reihe von Verfassern vermutet haben, von der entwickelten Säure herrühren; diese Annahme scheint noch die vorherrschende zu sein.

Eine andere naheliegende Deutung des Versuches, die von verschiedenen Verfassern angeführt wird, ist die, daß, wenn die Bakterien gleichzeitig Kohlenhydraten und Proteinstoffen gegenübergestellt werden, sie die Nahrung so wählen, daß die Kohlenhydrate vorzugsweise ausgenutzt werden. Der Grund dafür, daß die Bakterien den Zucker bevorzugen, ist vielleicht in der leichteren Spaltbarkeit der Kohlenhydrate zu suchen.

Es ist hier noch ein ganz interessanter Hemmungsversuch anzuführen, auf den wir übrigens später zurückkommen werden. Da Lactose die Indolproduktion nur unvollständig hemmt, so lag es recht nahe, zu prüfen, wie sich eine Mischung von $^1/_4$ mol. Galaktose und $^1/_4$ mol. Glucose gestalten würde, wenn diese zugesetzt würden. Die Mischung ist ja wie $^1/_4$ mol. Lactose aufzufassen, hydrolysiert in die Komponenten Galaktose und Glucose. Der Versuch zeigte, daß die Mischung sich so gestaltete, als ab Glucose allein zugegen gewesen wäre. Das Aufhören der Indolbildung tritt an derselben Stelle ein, wie bei Zusatz von Glucose allein. Die Hemmung muß auch in dieser Mischung einzig und allein von der Glucose herrühren, da die Galaktose, wie wir gesehen haben (Tabelle III), nur bis zur Hälfte ungefähr die Bildung des Indols hemmt.

Aus diesem und aus einem anderen Versuch, zu dem wir gleich kommen werden, geht hervor, daß die Lactose nicht

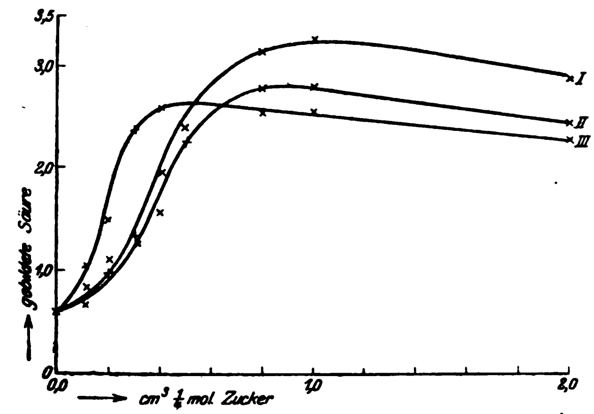
Tabelle VI.

Nr.	Mischung von 1/4 mol. Galaktose u. 1/4 mol. Glucose ccm	2%iges Peptonwasser ccm	Colorimeter
1	0,0	10,0	2
2	0,1	9,9	6
3	0,2	9,8	17
4	0,3	9,7	18
5	0,4	9,6	25
6	0,5	9,5	100
7	0,8	9,2	100
8	1,0	9,0	100
9	2,0	8,0	100

erst in die Komponenten Galaktose und Glucose gespalten wird, sondern als Lactose vergärt wird.

Um Aufschluß über das Verhalten des Bakterienwachstums zu bekommen, beschlossen wir, die Säureverhältnisse bei verschiedenen Zuckerkonzentrationen und die Ausnutzung des Zuckers in einer Reihe Kulturen mit den bekannten Zuckerzusätzen zu untersuchen. Wir gehen hier davon aus, daß, wenn sich nach Verlauf derselben Zeit mit steigendem Zuckerzusatz mehr Säure bildet, ein besseres Wachstum dort eintritt, wo die Säure in der größten Menge vorhanden ist.

Wie die Tabellen und Kurven zeigen, steigt die Säureproduktion schnell mit der Zuckerkonzentration auf ein Maxi-



Erklärung zur Fig. 1: Kurve *I* zeigt die bei Anwendung von Fructose, *II* die von Galaktose oder Glucose und hat auch Gültigkeit für eine Mischung von Galactose und Glucose, *III* die von Lactose.

mum und geht dann wieder ein wenig zurück. Das letztere Verhältnis haben alle Versuche ohne Ausnahme gezeigt (Tabelle VII, VIII, IX, X und XI, Fig. 1).

Tabelle VII.
Säurebildung bei Glucose.

Nr.	1/4 mol. Glucose ccm	2%iges Peptonwasser ccm	n/10-NaOH [1]) ccm
1	0,0	10,0	0,62
2	0,1	9,9	0,78
3	0,2	9,8	0,75
4	0,3	9,7	1,25
5	0,4	9,6	1,28
6	0,5	9,5	1,95
7	0,8	9,2	2,90
8	1,0	9,0	2,80
9	2,0	8,0	2,57

Tabelle VIII.
Säurebildung bei Lactose.

Nr.	1/4 mol. Lactose ccm	2%iges Peptonwasser ccm	n/10-NaOH ccm
1	0,0	10,0	0,70
2	0,1	9,9	0,42
3	0,2	9,8	2,10
4	0,3	9,7	2,38
5	0,4	9,6	2,49
6	0,5	9,5	2,54
7	0,8	9,2	2,51
8	1,0	9,0	2,58
9	2,0	8,0	2,38

Tabelle IX.
Säurebildung bei Galaktose.

Nr.	1/4 mol. Galaktose ccm	2%iges Peptonwasser ccm	n/10-NaOH ccm
1	0,0	10,0	0,70
2	0,1	9,9	0,90
3	0,2	9,8	0,95
4	0,3	9,7	1,20
5	0,4	9,6	1,60
6	0,5	9,5	1,84
7	0,8	9,2	2,67
8	1,0	9,0	2,50
9	2,0	8,0	2,41

[1]) Phenolphthalein als Indicator.

Tabelle X.
Säurebildung bei Fructose[1]).

Nr.	1/4 mol. Fructose ccm	2%iges Peptonwasser ccm	n/10-NaOH ccm
1	0,0	10,0	0,60
2	0,1	9,9	0,92
3	0,2	9,8	1,13
4	0,3	9,7	1,27
5	0,4	9,6	1,56
6	0,5	9,5	2,37
7	0,8	9,2	3,16
8	1,0	9,0	3,24
9	2,0	8,0	2,85

Tabelle XI.
Säurebildung bei Mischung von Galaktose und Glucose.

Nr.	1/4 mol. Galaktose + 1/4 mol. Glucose ccm	2%iges Peptonwasser ccm	n/10-NaOH ccm
1	0,0	10,0	0,70
2	0,1	9,9	0,86
3	0,2	9,8	0,91
4	0,3	9,7	1,12
5	0,4	9,6	1,41
6	0,5	9,5	1,80
7	0,8	9,2	2,47
8	1,0	9,0	2,38
9	2,0	8,0	2,63

Aus diesen Versuchen geht deutlich hervor, daß Lactose sich in einer besonderen Weise verhält, indem sie — wie aus der beginnenden Steigung der Kurve ersichtlich — eine weit stärkere Säurebildung als die anderen Zuckerarten verursacht. Man sieht auch, daß eine Mischung von Glucose und Galaktose (d. h. hydrolysierte Lactose) sich auch hier in Wirklichkeit so gestaltet, als ob die Glucose allein anwesend wäre. Auch dies zeigt, daß Lactose sich abspaltet und als Lactose vergoren wird, ohne erst zu Monosacchariden hydrolysiert zu werden. Diese Säureversuche lassen weiter vermuten, daß die Säure — in Übereinstimmung mit den Angaben Hirschlers und Auerbachs — nicht die Ursache der Hemmung der Indolproduktion ist; denn wenn man die gesamten Säurekurven betrachtet, so gehört die der Glucose zu denjenigen, die am

[1]) Fructose aus Inulin.

wenigsten Säure bilden. Wenn man den Punkt der Kurve festhält, wo sich bei der Glucose eine absolute Hemmung der Indolproduktion findet, und ihn mit den entsprechenden Punkten der anderen Zuckerkurven vergleicht, so sieht man, daß andere Zuckerarten sehr wohl eine größere Säureproduktion verursachen können, ohne hemmend auf die Indolbildung einzuwirken.

Wir können aber bei der angewandten Methode der Säuretitrierung nicht stehen bleiben. Es wird notwendig, die H-Ionenkonzentrationen zu messen, um zu sehen, ob diese wirklich bei den Zuckerarten größer waren, die keine oder nur eine geringe Hemmung zeigten.

Es zeigte sich auch bei solchen Versuchen, die darauf ausgingen, die H-Ionenkonzentration durch die Sörensensche colorimetrische Methode zu messen, daß die Wasserstoffionenkonzentration beim Glucosezusatz am niedrigsten war. Die Resultate waren in aller Kürze folgende: Beim Glucoseversuch ließ sich ein Indicator anwenden, dessen Umschlagspunkt zwischen 10^{-5} bis 10^{-7} (Paranitrophenol) ganz unten bei Glas Nr. 7 lag, während dieser Indicator beim Lactoseversuch nur bis Glas Nr. 3 und beim Galaktoseversuch bis Glas Nr. 6 ausreichte; dagegen mußte für die übrigen Gläser ein Indicator benutzt werden, wo der Umschlagspunkt zwischen $10^{-3,5}$ bis $10^{-5,7}$ lag, nämlich p-Benzolsulfonsäure-azo-α-naphthylamin.

Um zu entscheiden, ob die Säure wirklich bei der Hemmung der Indolbildung eine Rolle spielte, wurde eine Versuchsreihe auf gewohnte Weise mit einem Zusatz von Glucose angestellt und außerdem jedem Glas 1,5 g fein geriebenes $CaCO_3$ zugesetzt, autoklaviert und in den Thermostat gestellt. Der Versuch fiel so aus, daß die Hemmung erst in Glas Nr. 9 eintrat. Dies zeigt deutlich, daß die Säure bei der Hemmung keine Rolle spielt. Daß diese erst in Glas Nr. 9 eintritt, bedeutet unzweifelhaft, daß die Ausnutzung des Zuckers weit besser ist wegen der größeren Anzahl Bakterien, die jetzt in der Kultur zur Entwicklung kommen, wo alle Säure augenblicklich neutralisiert wird.

Das nächste wäre dann, zu untersuchen, wie der Verbrauch des Zuckers in einer solchen Reihe von Kulturen mit verschiedenen Zuckermengen ist. Um Aufschlüsse hierüber zu bekommen, wurde die gewöhnliche Reihe von Kulturen mit denselben Glucosemengen wie bei den Hemmungsversuchen hergestellt, 43 Stun-

den in den Thermostat gestellt und nach **Bangs** Methode titriert. Für diesen Versuch wurde eine weitere Reihe von Glucosegläsern bereitet, die mit der andern Reihe zugleich im Thermostat eingebracht wurde, nur mit dem Unterschiede, daß diesen Gläsern keine Bact. coli zugesetzt wurden. Diese sterilen Gläser mit derselben Nährflüssigkeit, wie in den infizierten Kulturen, wurden als Kontrolle und Maßstab dafür angesetzt, um zu erkennen, wie genau die Titrierung nach **Bang** vor sich ginge.

Wie man aus dem Diagramm und der Tabelle ersieht (Fig. 2, Tabelle XII), verzehren die Bakterien die ganze zugesetzte Zuckermenge in den ersten 5 Gläsern und stellen sich dann

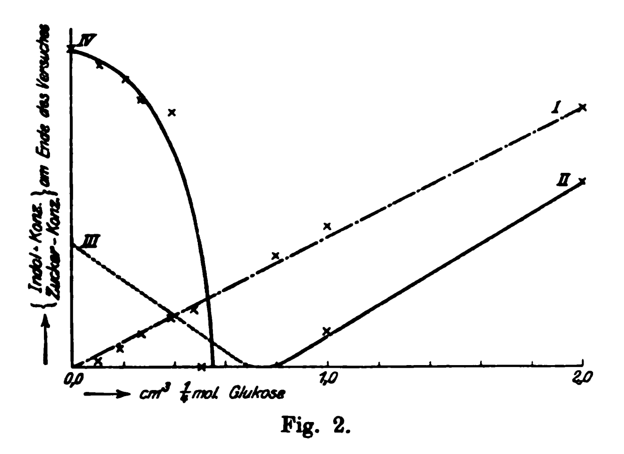


Fig. 2.

auf einen einigermaßen konstanten Zuckerverbrauch ein; der Verbrauch scheint nur etwas kleiner zu werden, wenn mehr Zucker zugesetzt wird. Im Diagramm ist die punktierte Kurve (*I*) die zugesetzte Zuckermenge im Kontrollversuche, während die aufgezogene Kurve (*II*) die übriggebliebene Menge Zucker beim Schluß des Bakterienversuches zeigt. Der punktierte Kurvenzweig (*III*) ist durch Extrapolation gebildet und gibt an, wieviel mehr Zucker die Bakterien verbraucht haben könnten, als die Menge, die sie wirklich bekamen. Kurve *III* gibt also ein Maß für das Fehlen des Zuckers, wie es sich an diesen Stellen des Versuches findet. Die Ordinate ist als willkürliche Einheit angegeben. Im Diagramm ist nämlich Kurve *IV* ein Maß für die Indolmenge, die bei Schluß des Versuches als vorhanden gefunden wurde (Colorimeter). Man sieht, daß diese

Kurve die Abszissenachse in der unmittelbaren Nähe des Punktes schneidet, wo sich ein Überschuß an Zucker zu zeigen beginnt, was also bedeutet, daß die Indolmenge unter diesen Verhältnissen unter die Menge gesunken ist, die sich mit Ehrlichs Reagens nachweisen läßt. Auch für das Indol ist die Ordinateneinheit willkürlich gewählt.

Tabelle XII.

Zuckertitrierung nach Bang.

Nr.	1/4 mol. Glucose ccm	Kultur mit Bakterien Zucker pro 10 ccm mg	Kultur ohne Bakterien Zucker pro 10 ccm mg
1	0,0	0,0	0,0
2	0,1	1,0	1,0
3	0,2	0,5	3,1
4	0,3	0,0	9,3
5	0,4	0,5	13,1
6	0,5	0,0	15,5
7	0,8	0,5	33,9
8	1,0	11,9	41,5
9	2,0	54,1	76,1

In der Tabelle haben wir die Resultate der Zuckertitrierungen im korrigierten Zustand angeführt. Es zeigte sich nämlich, daß das Pepton selbst eine Reduktion der Kupferlösung bewirkte und daß daher eine konstante Zahl von sämtlichen Bestimmungen abgezogen werden mußte. Die Größe dieses Fehlers wurde bei jeder Versuchsreihe besonders bestimmt.

Auf Grund dieser Versuche stellten wir für die Hemmung der Indolbildung folgende Erklärung auf: Die Bakterien wählen ihre Nahrung. Sie müssen unter allen Umständen das Pepton zerstören, um ihren N-Verbrauch decken zu können. Wenn sie eine genügende Kohlenhydratnahrung haben, so wird diese Spaltung nicht weiter durchgreifend sein, so daß die Indolproduktion gleich Null wird. Dagegen wird sich bei der Kohlenhydratspaltung reichlich Säure bilden. Wenn die Kohlenhydratmenge nicht ausreichend ist, so müssen die Bakterien ihren Energieverbrauch durch eine weitgehende Spaltung des Peptons zu decken versuchen.

Diese Hypothese kann indessen nicht erklären, warum bei den anderen Zuckerarten keine absolute Hemmung eintritt. Und wenn sie richtig sein sollte, so müßte man nachweisen können, daß die Indolreaktion um so später eintrete, je mehr

Pepton die Nährlösung enthalte. Daß dies nicht geschieht, habe ich durch eine besondere Versuchsreihe konstatieren können.

Beim Durchsuchen der Literatur fand ich mehrmals die Angabe (Oppenheimers), daß verschiedene Zuckerarten die Wirkung gewisser Enzyme z. B. die Maltasewirkung durch Glucose, die Invertasewirkung durch Glucose und Fructose usw. hemmen konnten.

Die in der Einleitung zitierte Arbeit von Auerbach über Hemmung der Peptonisierung von Gelatinekulturen gehört auch hierher. Auch die hier beschriebene Hemmung der Indolbildung durch Zuckerarten läßt sich am besten durch eine speziell inaktivierende Eigenschaft des Zuckers dem proteolytischen Colienzym gegenüber erklären. Auerbach glaubte, daß das tryptische Ferment bei den peptonisierenden Bakterien überhaupt gar nicht zur Entwicklung käme, wenn Zucker vorhanden war; mir scheint indessen die Erklärung die natürlichste, daß es sich um eine wirkliche Inaktivierung des schon im voraus gebildeten Enzyms handelt. Arbeiten von Michaelis u. a. haben schon viele Fragen betreffs der Inaktivierung von Enzymen durch elektrochemische oder mechanische Adsorption der aktiven Masse beleuchtet, vielleicht handelt es sich hier um ähnliche Prozesse.

Die hemmende Einwirkung auf die Indolbildung bei Coli, welche die Glucose besitzt, muß also meiner Meinung nach als eine besondere Eigenschaft der Glucose betrachtet werden. Das Diagramm (Fig. 2) zeigt nämlich, daß die Hemmung der Indolbildung in der Nähe des Punktes eintritt, wo sich noch ein Überschuß an Zucker findet. Daß die beiden Punkte nicht gerade zusammenfallen, läßt sich teils aus Versuchsfehlern erklären und teils daraus, daß der Zucker, selbst in Versuchen, bei denen man Hemmung findet, obwohl er am Ende dieser Versuche gänzlich verbraucht ist, trotzdem das proteolytische Enzym inaktiviert hat, solange der Zucker als solcher vorhanden gewesen ist; das bedeutet also, daß derselbe längere Zeit in Glas Nr. 5 als in Glas Nr. 4 und Nr. 4 wiederum längere Zeit als in Nr. 3 usw. seine inaktivierende Wirkung ausgeübt hat, nachdem von Anfang des Versuches an mehr Zucker vorhanden war. Erst nachdem alles Zucker vergoren ist, kann das proteolytische Enzym seine Wirksamkeit entfalten.

Dies würde sicherlich eine praktische Bedeutung bekommen können, wenn man die starke Indolbildung im Darmkanal des Menschen durch Einführung größerer Zuckermengen in den Verdauungstraktus verhindern könnte. Man benutzt in dieser Weise ein Mittel, das keineswegs die Symbiose zwischen dem Menschen und dem Bact. coli berühren wird, sondern die besseren Eigenschaften dieser Bakterien reinzuzüchten sucht und es vielleicht nach Zeiten dahin bringt, daß sie sich in einer für den Menschen günstigeren Form zeigen.

Zusammenfassung.

1. Von den Zuckerarten: Lactose, Maltose, Galaktose, Glucose und Fructose hemmt nur die Glucose die Indolproduktion beim Bact. coli vollständig. Die Hemmung tritt absolut nach 43 Stunden ein, bei einer Konzentration von zwischen 1,80‰ und 2,25‰.

2. Die gebildete Säure spielt bei der Hemmung keine Rolle. Weder die Wasserstoffionenkonzentration noch die Konzentration undissoziierter Säuren kann der Grund für die Hemmung sein.

3. Sowohl die Säurekurve als auch der Hemmungsversuch mit einer Mischung von Galaktose und Glucose machen es wahrscheinlich, daß die Lactose nicht erst vom Bact. coli hydrolysiert wird, sondern als Lactose vergoren wird.

4. Die Ursache der Hemmung rührt von einer speziellen Eigenschaft der Glucose her, nämlich der, das proteolytische Enzym beim Bact. coli zu inaktivieren.

Bei den einzelnen Versuchen ist die Peptonmenge bis um 20% ihres Wertes variiert worden; Kontrollversuche aber zeigten, daß diese Inhomogenität der Versuchsbedingungen überhaupt keine Rolle spielte.

Literatur.

W. Auerbach, Arch. f. Hygiene **31**, 311, 1897.
Ehrlich, Med. Woche **1901**, Nr. 15.
Fischer, Zeitschr. f. Chirurgie **22**.
Hirschler, Zeitschr. f. phys. Chem. **10**, 1886.
Schmitz, Zeitschr. f. phys. Chem. **19**, 378, 1894.
Schmitz, ebenda **19**, 401, 1894.
C. Oppenheimer, Die Fermente. 4. Aufl. 1913.
Seelig, Virchows Archiv **146**, 53, 1896.
Pröscher, Zeitschr. f. phys. Chem. **31**, 520.

2,5-Diketopiperazine und Formoltitrierung.

Von

P. Glagolew.

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der Medizinischen Hochschule für Frauen zu St. Petersburg.)

(Eingegangen am 27. Juli 1914.)

Das Studium der hydrolytischen Spaltung der Proteinkörper unter Einwirkung verschiedener proteolytischer Fermente ist wesentlich durch die Formoltitrierung nach S. P. L. Sörensen gefördert worden, die die Möglichkeit bietet, die Gesamtanzahl der NH_2-Gruppen im vorliegenden Gemisch der Verdauungsprodukte zu bestimmen. Der zeitliche Verlauf der Freisetzung der NH_2-Gruppen kennzeichnet den gegebenen Fermentprozeß, und im allgemeinen ist die Umwandlung um so weitgehender, je höher der auf die Gesamtstickstoffmenge bezogene Prozentgehalt an $(NH_2)N$ ist. Wir kennen jedoch einen Fermentativprozeß, bei dem nicht ein Anwachsen, sondern Abnahme der Gesamtmenge der $(NH_2)N$-Gruppen beobachtet wird. Die erwähnte Erscheinung geht in konzentrierten Albumoselösungen und in Peptonlösungen vor sich und steht mit der Bildung sog. Plasteine in Verbindung[1]). Das Studium des Prozesses der „Plasteinbildung" wird natürlicherweise sich weiterhin mit Körperklassen definierter chemischer Individuen — den Polypeptiden und Aminosäuren — zu befassen haben. In Zusammenhang hiermit ist es notwendig, experimentell zu erweisen, welche chemischen Prozesse gegebenenfalls die Ver-

[1]) Henriques und Gjaldbäck, Zeitschr. f. phys. Chem. 71, 485, 1911; 81, 439, 1912. — P. Glagolew, diese Zeitschr. 50, 162, 1913; 56, 195, 1913.

ringerung bzw. den Zusammenschluß der freien NH_2-Gruppen charakterisieren können. Theoretisch sind zwei Prozesse denkbar: 1. Verlängerung der Kette des Peptides bzw. der Peptide und 2. Bildung zyklischer Anhydridformen bzw. -gruppen, sog. Diketopiperazine. Dieser sowie jener Prozeß ist ein Dehydratationsvorgang — Anhydridbildung im weiteren Sinne des Wortes — und von diesem Gesichtspunkt betrachtet ist der vorliegende Prozeß dem Hydrolyseprozeß entgegengesetzt.

Inwiefern im gegebenen Falle die Bildung von Diketopiperazinen möglich ist, ist nicht vorauszusagen, denn die biologische Rolle dieser Stoffe ist bisher nur außerordentlich wenig geklärt.

Wir sind der Ansicht, daß bei Klärung der physiologischen Rolle und biologischen Bedeutung der Diketopiperazine überhaupt, sowie der Möglichkeit ihrer Bildung in konzentrierten Lösungen der Eiweißspaltungsprodukte die Methode der Formoltitrierung nach Sörensen uns gute Dienste leisten kann.

Vorliegende Untersuchung stellte sich zur Aufgabe zu prüfen, wie verschiedene Diketopiperazine sich zu Formol verhalten, und ob, wie auf Grund ihrer chemischen Struktur zu erwarten war, sie bei Bestimmung der $(NH_2)N$-Gruppen nach Sörensen wie neutrale Körper reagieren.

Als Grundlage der experimentellen Nachprüfung diente der Umstand, daß in einzelnen Fällen die Imidogruppe mit Formol wie die Amidogruppe reagiert (Prolin, partiell nach Sörensen titrierbar); andrerseits ist beim Titrieren mit $^1/_5$ n-KOH die Möglichkeit partieller Hydrolyse der im allgemeinen durch Alkalien leicht aufzuspaltenden Diketopiperazine nicht ausgeschlossen.

In den Untersuchungen von Sörensen findet sich der Hinweis, daß Glycinanhydrid[1]) sich beim Titrieren mit Formol wie ein indifferenter Körper verhält[1]); in der vorliegenden Arbeit ist die Titration nach der Methode von Sörensen auf verschiedene Diketopiperazine ausgedehnt worden, und zwar auf Glycinanhydrid, Alaninanhydrid, Tyrosinanhydrid und Glycinleucinanhydrid.

---

[1]) S. P. L. Sörensen, Enzymstudien. Diese Zeitschr. 7, 75, 1906.

Experimenteller Teil.

Die genannten Anhydride sind nach den Angaben von E. Fischer[1]) dargestellt worden. Da diese Diketopiperazine in Wasser schwerlösliche Verbindungen vorstellen, so wurden sie bei der Formoltitrierung mit Wasser durchgeschüttelt und nach Zusatz von gegen Phenolphthalein neutralem Formol mit $^1/_{4,5}$ n-KOH [1 ccm = 3,11 mg $N(NH_2)$] titriert. Gewöhnlich trat nach Hinzufügung von 1 bis 2 Tropfen der Alkalilauge vollständige Lösung ein. Titriert wurde mit Phenolphthalein als Indicator bis zu deutlicher Rotfärbung. Unter a) sind die Kontrollversuche mit Wasser, unter b) die Titrationsergebnisse der untersuchten Stoffe unter Anwendung derselben Wasser- und Formolmengen, wie bei den Kontrollversuchen angeführt.

I. Glycinanhydrid.

Erhalten beim Stehen von Glycinäthylester. Der dargestellte, in Prismen krystallisierte Niederschlag wurde mit kaltem Wasser und Äther ausgewaschen.

°/₀ N	
Ber.	Gef.
24,56	14,42

Formoltitrierung:

1. 0,2050 g Glycinanhydrid = 0,0503 g N wurden in 10 ccm H_2O suspendiert; nach Zusatz von 5 ccm HCHO wurde beim Titrieren mit $^1/_{4,5}$ n-KOH verbraucht:

   bei a) 0,10 ccm
   b) 0,15 „
   gebunden 0,05 ccm.

2. Verwandt wurden 0,1790 g Glycinanhydrid, in 10 ccm $^1/_{4,5}$ n-KOH unter Hinzufügung eines Tropfens Phenolphthalein gelöst, zugesetzt 5 ccm HCHO. Es gelang nicht gegenüber dem Kontrollversuch eine Farbänderung zu bemerken.

II. Lactimid.

Dargestellt aus Alaninäthylester bei 24 stündigem Erwärmen im zugeschmolzenen Rohr auf 180°. Die erhaltene Krystall-

[1]) E. Fischer, Untersuchungen über Aminosäure, Polypeptide und Proteine. Berlin 1906.

masse (feine Nadeln) wurde aus Wasser umkrystallisiert, mit Alkohol und Äther gewaschen. Schmelzpunkt 270° (unkorr.).

% N	
Ber.	Gef.
19,75	19,90

Zur Untersuchung gelangten 0,1272 g = 0,0242 g N, was beim Titrieren nach Sörensen 7,8 ccm einer $^1/_{4,5}$ n-KOH-Lösung entsprechen würde; suspendiert in 10 ccm H_2O, zugesetzt 5 ccm HCHO; nach Hinzufügen von 2 bis 3 Tropfen Alkalilauge trat allmählich vollständige Lösung ein.

Beim Titrieren wurde verbraucht:

a) 0,1 ccm $^1/_{4,5}$ n-KOH
b) 0,4 " $^1/_{4,5}$ n-KOH
gebunden 0,3 ccm $^1/_{4,5}$ n-KOH

= 0,93 mg N, entsprechend 0,7 % des Gesamtstickstoffs des gegebenen Präparats.

III. Tyrosinanhydrid.

Erhalten aus Tyrosinäthylester durch Erhitzen im zugeschmolzenen Rohr bei 170 bis 185° im Verlauf von 22 Stunden. Die erhaltene grüngelbe Masse wurde mit Essigäther, Alkohol und Äther ausgekocht und mit Tierkohle aus Wasser umkrystallisiert. Die erhaltene, leicht gelb gefärbte Masse schmolz unter Verkohlen bei 280°.

% N	
Ber.	Gef.
8,59	8,80

Zum Titrieren benutzt wurden 0,1702 g = 0,0150 g N, was 4,8 ccm $^1/_{4,5}$ n-KOH entsprechen müßte; suspendiert in 20 ccm H_2O, beim Zusatz von Formol und 1 bis 2 Tropfen KOH trat keine vollständige Auflösung ein.

Verbraucht beim Titrieren:

a) 0,1 ccm $^1/_{4,5}$ n-KOH
b) 0,2 " $^1/_{4,5}$ n-KOH
gebunden 0,1 ccm $^1/_{4,5}$ n-KOH

= 0,311 mg N = 0,18 % N.

IV. Glycylleucinanhydrid.

Dargestellt aus Glycylleucin, das seinerseits aus Chloracetylleucin erhalten war; letzteres war aus Leucin „Kahl-

baum" und Chloracetylchlorid synthesiert worden. Das Dipeptid wurde durch 10minutiges Erwärmen auf dem Paraffinbad bei 240° (beim Schmelzpunkt des Dipeptides) anhydriert. Durch Umkrystallisieren des Anhydrids aus heißem Alkohol wurden mikroskopische, hübsche, durchsichtige Nadeln erhalten, die in Wasser schwerlöslich waren.

% N	
Ber.	Gef.
16,49	16,58

Zum Titrieren benutzt wurden 0,1272 g = 0,0211 g N, was beim Titrieren 6,8 ccm $^1/_{4,5}$ n-KOH entsprechen würde; suspendiert, d. h. aufgeschlämmt in 20 ccm H_2O; nach Zusatz von 10 ccm HCHO und 2 bis 3 Tropfen $^1/_{4,5}$ n-KOH trat vollständige Auflösung ein.

Verbraucht beim Titrieren mit $^1/_{4,5}$ n-KOH:

a)	0,1 ccm
b)	0,3 „
gebunden	0,2 ccm

= 0,622 mg N, entsprechend nahezu 0,5 % N des Glycylleucinanhydrides. Beim Stehen bis zum nächsten Tage trat keine Farbänderung ein.

Aus allen angeführten Experimentaldaten geht hervor, daß die Diketopiperazine als mit Formol praktisch nicht reagierende Stoffe anzusehen sind und, im Gegensatz zu den Aminosäuren und Peptiden, nicht nach dem Verfahren von S. P. L. Sörensen zu titrieren sind.

Über die Methode zur getrennten Bestimmung von Phenol und Parakresol im Harn.

Von

M. Siegfried und R. Zimmermann.

(Aus der chemischen Abteilung des Physiologischen Instituts der Universität Leipzig.)

(Eingegangen am 11. März 1915.)

Seit der Veröffentlichung unserer Methode[1]) ist diese sehr häufig im hiesigen Laboratorium angewandt worden. Besonders hat mit ihr Herr Walter Schlosser, der umfassende Untersuchungen über die Bestimmung der Phenole im Harne ausgeführt hat, gearbeitet. Herr Schlosser hat seine dem Abschluß nahen Untersuchungen unterbrochen, um als Kriegsfreiwilliger ins Heer einzutreten. Wir hatten ursprünglich die Absicht, über unsere weiteren Erfahrungen mit der Methode im Anschluß an die Veröffentlichung der Untersuchungen des Herrn Schlosser zu berichten. Da sich diese Veröffentlichung des Herrn Schlosser nunmehr auf unbestimmte Zeit verzögern muß, teilen wir folgende Untersuchungen mit.

Bei der Anwendung der Methode durch verschiedene Bearbeiter hat sich ergeben, daß nach oft langen Reihen sicherer Resultate, die bei Lösungen von bekanntem Gehalte an Kresol und Phenol gewonnen wurden, Analysenwerte nicht unwesentlich herausfielen, ohne daß der Grund des Mißerfolges zu erkennen war.

Unsere Versuche haben uns gezeigt, daß die Sicherheit der Resultate durch relativ kleine Abweichungen bei einzelnen Phasen der Methode beeinträchtigt werden kann. So hat schon Herr Schlosser den Einfluß der Temperatur der Lösungen

---

[1]) Diese Zeitschr. **29**, 368, 1910.

bei den Bestimmungen von b_1 und b_2 studiert und ist zu dem Ergebnis gelangt, daß die Überschreitung einer Temperaturgrenze nachteilig ist. Am sichersten geht man, wenn man bei Bestimmung von b_1 vor Zusatz der Bromidbromatlösung auf 15° C abkühlt und dann 1 Stunde in Eiswasser stehen läßt; bei Bestimmung von b_2 vor dem Zusatz der Bromidbromatlösung auf + 5° C abkühlt und nach Zusatz der Bromidbromatlösung 15 Min. in Eiswasser stehen läßt. Vor dem Abkühlen läßt man nach Zusatz des Wassers und der Säure $^1/_2$ Stunde bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Die in dieser Weise ausgeführten Bestimmungen gaben folgende Werte:

Tabelle I.

Nummer	ccm Bromidbromatlösung für		Verbr. ccm $^n/_{10}$ $Na_2S_2O_3$		Gefundene Mengen		Angew. Mengen		Differenz		Titer der Bromidbromatlösung für 100 ccm
	b_1	b_2	b_1	b_2	Kresol	Phenol	Kresol	Phenol	Kresol	Phenol	
1	123,2	109,5	5,3	8,6	0,0404	0,0139	0,0395	0,0136	+ 0,0009	+ 0,0003	0,2374
2	132,0	117,3	4,7	5,6	0,0285	0,0293	0,0280	0,0294	+ 0,0005	– 0,0001	0,2374
3	117,0	104,0	4,4	4,6	0,0220	0,0285	0,0232	0,0260	– 0,0012	+ 0,0025	0,2374
4	127,7	113,5	3,1	7,9	0,0487	0,0122	0,0494	0,0113	– 0,0007	+ 0,0009	0,2374
5	125,1	111,2	3,95	6,9	0,0382	0,0188	0,0362	0,0192	+ 0,0020	– 0,0004	0,2374
6	92,7	82,4	2,65	5,5	0,0320	0,0112	0,0313	0,0113	+ 0,0007	– 0,0001	0,2374
7	130,8	116,3	5,75	7,6	0,0332	0,0230	0,0329	0,0226	+ 0,0003	+ 0,0004	0,2374
8	100,0	89,0	1,55	5,8	0,0406	0,0088	0,0411	0,0090	– 0,0005	– 0,0002	0,2374
9	124,0	110,2	2,95	6,75	0,0427	0,0160	0,0428	0,0158	– 0,0001	+ 0,0002	0,2374
10	140,1	124,5	5,3	7,2	0,0352	0,0263	0,0362	0,0249	– 0,0010	+ 0,0014	0,2374
11	131,1	116,5	5,9	6,6	0,0272	0,0283	0,0280	0,0271	– 0,0008	+ 0,0012	0,2382
12	133,5	118,7	2,85	8,65	0,0552	0,0099	0,0526	0,0113	+ 0,0026	– 0,0014	0,2382
13	112,5	100,0	8,05	5,4	0,0059	0,0348	0,0066	0,0339	– 0,0007	+ 0,0009	0,2382
14	112,5	100,0	3,05	8,45	0,0493	0,0049	0,0494	0,0045	– 0,0001	+ 0,0004	0,2382
15	134,5	119,5	6,85	9,65	0,0393	0,0179	0,0362	0,0181	+ 0,0031	– 0,0002	0,2382
16	132,6	117,9	3,45	7,55	0,0458	0,0166	0,0461	0,0158	– 0,0003	+ 0,0008	0,2382
17	121,8	108,3	4,3	7,1	0,0368	0,0181	0,0362	0,0181	+ 0,0006	± 0,0000	0,2382
18	81,2	72,2	3,5	5,5	0,0254	0,0104	0,0230	0,0113	+ 0,0024	– 0,0009	0,2382

Bei Beobachtung der Ausführung der Methode von verschiedenen Praktikanten des Laboratoriums wurde gefunden, daß bei Bestimmung von b_1 während des Zusatzes von Bromidbromatlösung übermäßig stark geschüttelt wurde. In solchen Fällen setzt sich der Niederschlag oben in der Flüssigkeit ab, anstatt in derselben gleichmäßig verteilt suspendiert zu bleiben. Hierdurch wird bewirkt, daß zu wenig Brom gebunden wird. Bekanntlich ist es notwendig, daß bei der Bestimmung von b_1

die Bedingungen so gewählt werden, daß vor der Filtration das Phenol in Tribromphenol und das Kresol in Tribromkresol völlig übergeführt wird. Ballt sich jedoch infolge zu starken Schüttelns der Niederschlag zu fest zusammen, so geht ein Teil des Kresols nur in Dibromkresol über und man erhält zu niedrige Werte für b_1'.

Wir haben versucht, die Resultate von der Art des Schüttelns unabhängig zu machen, indem wir durch Zusatz geringer Mengen eines Schutzkolloids das Zusammenballen des Niederschlages verhüteten. Tatsächlich gelingt es, durch Zusatz ganz geringer Mengen einer 1 %igen Lösung von Gummi arabicum dies zu erreichen; es ist aber dann schlechterdings nicht möglich, den Niederschlag durch Glaswolle einigermaßen schnell zu filtrieren.

Eine Ursache für eine relativ größere Differenz der gefundenen von den gegebenen Kresol- und Phenolmengen liegt bisweilen darin, daß zwar die gefundenen Werte von b_1 und b_2 von den berechneten nur sehr unbedeutend abweichen, daß aber bei b_1 ein klein wenig zu viel Brom, bei b_2 ein klein wenig zu wenig Brom gefunden wird. So bei folgendem Beispiele: 0,0263 g Kresol und 0,0181 g Phenol angewandt.

Gefunden b_1: 0,2114; berechnet b_1: 0,2092; Diff.: + 0,0022
" b_2: 0,1692; " b_2: 0,1702; " : — 0,0010
gefunden Kresol: 0,0285 Diff.: + 0,0022
" Phenol: 0,0166 " : — 0,0015.

Der gefundene b_1-Wert differiert also von dem berechneten nur um ca. 1 %, der gefundene b_2-Wert von dem berechneten nur um ca. 0,6 %. Trotzdem differiert der gefundene Kresolwert von dem berechneten um ca. 9 %, der gefundene Phenolwert von dem berechneten um ca. 8 %. Da wir nun weiter fanden, daß häufig die Differenz beim b_2-Wert negativ ist, die beim b_1-Wert jedoch positiv, so versuchten wir durch Vergrößerung der Menge der Bromidbromatlösung bei der b_2-Bestimmung die gebundene Brommenge um ein wenig zu erhöhen. So haben wir eine Anzahl Versuche ausgeführt, bei denen wir die nach unserer Vorschrift sich aus dem Zusatz der Bromidbromatlösung bis zum Eintritt der gelben Farbe bei der b_1-Bestimmung sich ergebende Menge Bromidbromatlösung um 1 % erhöhten. Es wird auf diese Weise die Differenz zwischen b_1 und b_2 verringert; wenn sich auch trotz des erhöhten Zusatzes

bei der Bestimmung von b_2 auch bisweilen negative Werte für b_2 ergeben, so sind dann auch die Werte für b_1 negativ. Der Grund für derartige Differenzen, die auf das Gesamtresultat nicht von wesentlichem Einfluß sind, liegt in der subjektiven Verschiedenheit bei der Festsetzung des Eintritts der gelben Färbung bei der Bestimmung von b_1. Es sei noch darauf aufmerksam gemacht, daß es notwendig ist, für die Bestimmung von b_1 langfaserige Glaswolle zu benutzen, die ein rascheres Filtrieren gestattet.

Im folgenden sind die Resultate von Bestimmungen nach der etwas modifizierten Methode gegeben. Die genauen Vorschriften werden hinter der Tabelle angegeben.

Tabelle II.

Nummer	ccm Bromid-bromat-lösung für		Verbr. ccm $^n/_{10}$ $Na_2S_2O_3$		Gefundene Mengen		Angew. Mengen		Differenz	
	b_1	b_2	b_1	b_2	Kresol	Phenol	Kresol	Phenol	Kresol	Phenol
1	148,2	133,0	6,25	6,8	0,0274	0,0356	0,0263	0,0362	+ 0,0011	− 0,0006
2	112,5	101,0	5,1	6,4	0,0255	0,0224	0,0263	0,0217	− 0,0008	+ 0,0007
3	141,5	127,1	5,4	8,2	0,0383	0,0243	0,0365	0,0253	+ 0,0018	− 0,0010
4	112,5	101,0	3,45	5,3	0,0285	0,0223	0,0296	0,0221	− 0,0011	+ 0,0020
5	121,5	109,1	3,7	5,65	0,0305	0,0244	0,0296	0,0253	+ 0,0009	− 0,0009
6	90,0	81,0	3,05	4,45	0,0221	0,0180	0,0228	0,0181	− 0,0007	− 0,0001
7	104,2	93,5	5,65	5,6	0,0170	0,0250	0,0160	0,0253	+ 0,0010	− 0,0003
8	107,6	96,55	5,8	5,5	0,0162	0,0271	0,0182	0,0253	− 0,0020	+ 0,0018
9	95,1	85,3	3,25	4,75	0,0239	0,0185	0,0251	0,0181	− 0,0012	+ 0,0004
10	84,4	75,8	3,6	4,7	0,0197	0,0166	0,0182	0,0181	+ 0,0015	− 0,0015
11	102,4	91,9	5,9	7,25	0,0242	0,0175	0,0251	0,0163	− 0,0009	+ 0,0012
12	110,25	99,0	6,15	7,3	0,0243	0,0207	0,0228	0,0217	+ 0,0015	− 0,0010
13	127,7	114,6	6,05	7,3	0,0278	0,0260	0,0274	0,0253	+ 0,0004	+ 0,0007

Titer der Bromidbromatlösung 100 ccm = 0,2382 g Br.

Die zu den in Tabelle I und II mitgeteilten Analysen verwendeten p-Kresol- und Phenollösungen waren hergestellt, indem frisch destilliertes p-Kresol und Phenol abgewogen und im Maßkolben gelöst wurde.

Das p-Kresol und Phenol waren von Kahlbaum bezogen. Das zu den Analysen von Nr. 3 bis 13 verwendete p-Kresol war aus p-Toluidin synthetisch dargestellt.

Die Lösungen wurden nach Keppler und Koppeschaar kontrolliert.

Vorschriften zur Ausführung der Methode.

Erforderliche Lösungen.

1. $^{n}/_{10}$-Natriumthiosulfatlösung.
2. Kaliumbromidbromatlösung, im Liter 0,834 g Kaliumbromat und 2,97 g Kaliumbromid enthaltend. Der Titer wird bestimmt.
3. 5 $^{0}/_{0}$ ige Jodkaliumlösung, die nach Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure Stärkelösung nicht bläuen darf.
4. 0,5 $^{0}/_{0}$ ige Stärkelösung, aus löslicher Stärke bereitet.
5. Schwefelsäure, aus gleichem Volumen Wasser und konzentrierter Schwefelsäure bereitet.
6. Zirka 25 $^{0}/_{0}$ ige Salzsäure.

A. Bestimmung von b_1.

In einem ca. 500 ccm fassenden, mit Glasstopfen versehenen, dickwandigen Erlenmeyer-Kolben versetzt man die genau gemessene Menge der wässerigen Lösung des Phenol-p-Kresolgemisches (sofern sie nicht wenigstens 100 ccm beträgt, verdünnt man sie mit Wasser auf dieses Volumen) mit 25 ccm Schwefelsäure (1 : 1), schüttelt um und läßt die Mischung mindestens $^{1}/_{2}$ Stunde bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Dann kühlt man sie in Eiswasser bis auf 15° C ab, setzt aus der Bürette unter ständiger gelinder Bewegung der Flüssigkeit in langsamem Strahle so viel Kaliumbromidbromatlösung hinzu, bis eine eben bemerkbare Gelbfärbung der Flüssigkeit eintritt. Um diesen Punkt genau zu erkennen, hat man unter die Flasche einen Bogen weißes Papier gelegt. Dann setzt man tropfenweise den 8. Teil der verbrauchten Menge Bromidbromatlösung unter gelinder Bewegung hinzu. Es kommt darauf an, daß der Niederschlag in der Flüssigkeit verteilt suspendiert ist und sich nicht an der Oberfläche der Flüssigkeit zusammenballt. Darauf läßt man die Mischung in der verschlossenen Flasche eine Stunde lang in Eiswasser stehen. Hierauf wird unter Vermeidung von Bromverlust in einem abgeschliffenen, mit Glasplatte zu bedeckenden Trichter durch langfaserige Glaswolle in 30 ccm 5 $^{0}/_{0}$ ige Jodkaliumlösung filtriert, die erste Flasche mit Wasser gut nachgespült, mit diesem zur Absorption freier Bromdämpfe gut durchgeschüttelt und mit diesem Wasser der Niederschlag ausgewaschen. Im Filtrate wird mit $^{n}/_{10}$-Thiosulfatlösung das Jod titriert.

B. Bestimmung von b_2.

Die gleiche Menge der Lösung des Phenol-p-Kresolgemisches wie in A verdünnt man in einer mit Glasstopfen versehenen Literflasche auf ca. 500 ccm und fügt 30 ccm 25%ige Salzsäure hinzu. Man läßt die Mischung mindestens $^1/_2$ Stunde bei gewöhnlicher Temperatur stehen und kühlt dann in Eiswasser auf 5° C ab. Dann fügt man unter gleichmäßigem langsamen Umschwenken die bei der Bestimmung von b_1 bis zum Eintritt der Gelbfärbung verbrauchten Kubikzentimeter Bromidbromatlösung plus den 100. Teil hinzu und läßt die Mischung $^1/_4$ Stunde in Eiswasser stehen. Nach 15 Minuten versetzt man die Mischung mit 30 ccm 5%iger Jodkaliumlösung, schüttelt allmählich um, bis die Flüssigkeit gleichmäßig gefärbt ist, und läßt die Mischung 1 Stunde vor Licht geschützt bei gewöhnlicher Temperatur stehen. Darauf schüttelt man kräftig durch und titriert das freie Jod mit $^n/_{10}$-Thiosulfatlösung.

Berechnung:

b_1 = die nach A gefundene Menge gebundenen Broms
b_2 = „ „ B „ „ „ „
x = „ gesuchten Mengen Parakresol
y = „ „ „ „

$$x = 0{,}67605 \cdot (b_1 - b_2)$$
$$y = 0{,}5884 \cdot b_2 - 0{,}3923 \cdot b_1 .$$

Den Titer der Bromidbromatlösung bestimmt man folgendermaßen:

In einem mit Glasstopfen versehenen Erlenmeyer-Kolben von ca. 250 ccm Inhalt werden 100 ccm Bromidbromatlösung mit 10 ccm 25%iger Salzsäure und mit 15 ccm 5%iger Jodkaliumlösung vermischt. Das freie Jod wird mit $^n/_{10}$-Thiosulfatlösung titriert, wobei die Stärkelösung erst gegen Ende der Reaktion zugefügt wird, d. h. wenn die Flüssigkeit nur noch gelb gefärbt ist. 1 ccm Thiosulfatlösung = 0,007992 Br.

Beiträge zur Kenntnis der Narkose.

III. Mitteilung.

Narkose und Erstickung.

Von

Hans Winterstein.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 12. März 1915.)

Mit 3 Figuren im Text.

1.

Die direkte Untersuchung des Einflusses, den die Narkose auf den O-Verbrauch des isolierten Froschrückenmarks ausübt, hatte in einer früheren Mitteilung[1]) zu der Schlußfolgerung geführt, daß die Narkose nicht auf einer Behinderung der Oxydationsprozesse beruhen könne, und daß zwischen diesen und den der Erregbarkeit zugrunde liegenden Vorgängen noch andere zwischengeschaltet sein müssen, die durch die Narkose beeinflußt werden. Die weitere Verfolgung dieser Frage führte mich zunächst dazu, den Einfluß der Narkose auf die Säurebildung in den Nervenzentren zu untersuchen.

Vor langen Jahren bereits hat Langendorff[2]) in einer vorläufigen Mitteilung, der leider eine ausführliche Publikation nicht gefolgt ist, und die vielleicht aus diesem Grunde nicht die Beachtung gefunden hat, die sie verdient, eine Reihe sehr bemerkenswerter Versuche über Entstehen und Verschwinden von Säure im Zentralnervensystem von Fröschen angestellt,

---

[1]) H. Winterstein, Beiträge zur Kenntnis der Narkose. II. Mitt. Diese Zeitschr. **61**, 81, 1914.

[2]) O. Langendorff, Zur Kenntnis der Zersetzungserscheinungen an den Muskeln und am Zentralnervensystem. Centralbl. f. med. Wiss. **1882**, Nr. 50.

von deren Ergebnissen hier nur die folgenden erwähnt seien: Das normalerweise alkalisch reagierende Zentralnervensystem wird bei Erstickung sauer, um so rascher, je höher die Temperatur ist. Auch Strychninvergiftung ebenso wie elektrische Reizung beschleunigen diese Säuerung. Bei völliger Erholung erstickter Frösche kehrt die normale chemische Reaktion wieder zurück; bei unvollkommen bleibender Erholung nach lange dauerndem O-Abschluß wird das Zentralnervensystem selbst nach längerer Zeit noch sauer gefunden.

Diese Beobachtungen Langendorffs boten die Möglichkeit, die Beziehungen zwischen Narkose und Erstickung nach einer neuen Richtung hin zu untersuchen und gleichzeitig die Beobachtungen der früheren Mitteilung auf einem anderen Wege nachzuprüfen. War die Narkose eine Erstickung, wie dies die Verwornsche Theorie annimmt, so mußte offenbar in Narkose trotz ausreichender O-Versorgung eine Säurebildung erfolgen; auch konnte der etwaige Einfluß der Narkose auf das Entstehen und Verschwinden der Säure bei Erstickung und Wiedererholung untersucht werden.

2.

Methodik. Die Versuche wurden an dem in der üblichen Weise präparierten isolierten Froschrückenmark ausgeführt, das in eine Kochsalzlösung eingetaucht war, durch die Sauerstoff, bzw. bei Erstickungsversuchen Stickstoff hindurchgeleitet wurde. Das als Index der Reflexerregbarkeit dienende Bein befand sich außerhalb der Lösung an der Luft, vor Vertrocknung geschützt. Zu den Narkoseversuchen diente wiederum Kochsalzlösung, die mit 5 Vol.-% Äthylalkohol oder mit 1 Gew.-% Äthylurethan versetzt war.

Über die Art der Reaktionsprüfung hat Langendorff leider keine methodischen Angaben gemacht; doch vermute ich, daß die Prüfung einfach mit Lackmuspapier erfolgte. Auch ich habe keinen anderen brauchbaren Weg gefunden. Es wäre natürlich von großem Interesse, die Erscheinungen der Säurebildung in den Nervenzentren quantitativ, etwa elektrometrisch, verfolgen zu können; einige in dieser Richtung unternommenen Versuche haben wegen der winzigen zur Verfügung stehenden Substanzmengen bisher zu keinem Ergebnis geführt.

Das folgende Verfahren hat sich schließlich als das praktischste erwiesen: Von dem auf seine Reaktion zu prüfenden Rückenmark wird am zentralen Ende ein 2 bis 3 mm hohes Stückchen abgeschnitten und auf einige Sekunden in kochendes Wasser geworfen, um ein leichteres Zerquetschen zu ermöglichen und eine nachträgliche Säurebildung zu verhindern. Das aus dem Wasser herausgehobene Gewebsstückchen wird auf eine weiße Porzellanplatte gelegt und mit zwei feinen Pinzetten die dunkle Pia mater, die den Zylinder in der Mitte ringförmig einzuschnüren pflegt, entfernt. Hierauf wird ein Streifen blaues Lackmuspapier (Kahlbaum) in das ausgekochte Wasser getaucht, rasch auf Filtrierpapier getrocknet, so daß es eben feucht, aber nicht naß ist, und darauf über das Rückenmarkstückchen gelegt und mit einem Glasstab aufgequetscht. Unter diesen Bedingungen tritt beim normalen, ausreichend mit Sauerstoff versorgt gewesenen Rückenmark keine oder nach einer Weile eine nur ganz schwache Rötung ein, was darauf hinweist, daß die [H˙] des normalen Rückenmarks vielleicht etwas über dem Umschlagspunkte des Indicators (p_H etwa = 6,8)[1]) liegt, die Reaktion mithin nicht alkalisch, sondern eher ein wenig sauer ist, wie dies Michaelis und Kramsztyk[2]) auch für den Gewebssaft anderer Organe gefunden haben. Mitunter beobachtet man aber auch Rückenmarkspräparate, die trotz ausreichender O-Versorgung und guter Erregbarkeit dauernd eine deutliche Rötung des Lackmuspapiers hervorrufen. Da eine Vergleichung der Rötungsgrade nur bei großen Differenzen zuverlässig ist, zumal die Reaktionsprüfungen ja zu verschiedenen Zeiten vorgenommen werden und die Intensität der Rötung auch von der Dauer der Einwirkung, der Größe der Rückenmarksstückchen und dergleichen abhängt, so kann in diesen Fällen die sichere Feststellung einer unter verschiedenen Einflüssen etwa eintretenden Verstärkung der Rötung Schwierigkeiten begegnen. In solchen Fällen kann man sich durch den Kunstgriff helfen, daß man eine zweite Reaktionsprüfung mit einem Streifen Lackmuspapier vornimmt, der statt mit Wasser mit

---

[1]) Vgl. L. Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration. S. 175. Berlin 1914.

[2]) L. Michaelis und A. Kramsztyk, Die Wasserstoffionenkonzentration der Gewebssäfte. Diese Zeitschr. 62, 180, 1914.

einer schwach alkalischen Lösung ($^n/_{200}$- bis $^n/_{100}$-NaOH) befeuchtet ist und nun nicht mehr gerötet wird. Auf diese Weise kann man durch Prüfung mit zwei Reagenspapieren die Reaktion des Gewebsstückchens gewissermaßen zwischen zwei Grenzen einschließen und dann Überschreitungen dieser Grenzen wieder mit Sicherheit feststellen.

3.

Ergebnisse. Nach völliger Erholung von der Präparation (etwa 1 stündigem Aufenthalt in O-gesättigter NaCl-Lösung) behält das Rückenmark bei ausreichender O-Versorgung seine anfängliche Reaktion viele Stunden hindurch unverändert bei. Wird der Sauerstoff der Lösung durch Stickstoff ersetzt, so tritt allmählich eine immer stärkere Anhäufung von Säure ein, die bereits sehr deutlich zu einer Zeit nachweisbar ist, in der die Reflexerregbarkeit noch gut erhalten erscheint. Wird die O-Entziehung nicht zu lange Zeit fortgesetzt, am besten nicht bis zu völligem Erlöschen der Erregbarkeit, so verschwindet bei O-Zufuhr die angesammelte Säure allmählich wieder, bis zur Rückkehr der ursprünglichen Reaktion, während bei zu lange fortgesetzter Erstickung eine gewisse Säuerung auch bei lang dauernder O-Zufuhr bestehen bleibt. Insoweit bestätigen die Beobachtungen in allen wesentlichen Punkten die Angaben von Langendorff.

Und nun der Einfluß der Narkose. Die Narkose ist anscheinend ohne jede Wirkung auf alle die eben geschilderten Erscheinungen. Eine vollständige Narkose mit Alkohol oder Urethan ruft auch bei mehrstündiger Einwirkung in O-gesättigter Lösung keine Säurebildung hervor. Wird das in O-gesättigter Lösung narkotisierte Rückenmark durch Durchleitung von Stickstoff erstickt, so erfolgt in Narkose in gleicher Weise Säuerung wie ohne dieselbe. Wird das ohne Narkose durch O-Mangel erstickte Rückenmark narkotisiert und dann bei fortbestehender Narkose Sauerstoff zugeführt, so verschwindet auch in Narkose die vorher angesammelte Säure. Für die Feststellung der letzteren Tatsache müssen gewisse Fehlerquellen vermieden werden. Es wurde bereits erwähnt, daß manche Rückenmarkspräparate dauernd auch bei ausreichender O-Versorgung eine leichte Rötung des Lackmuspapiers hervorrufen, und daß andererseits

die während der Erstickung angesammelte Säure nur dann bei O-Zufuhr völlig verschwindet, wenn die Erstickung nicht zu lange fortgesetzt wurde. Beachtet man diese beiden Tatsachen nicht, dann kann man mitunter durch das Bestehenbleiben einer Rötung zu dem Schlusse geführt werden, daß die Narkose das Verschwinden der Erstickungssäure verhindert habe. Es ist daher notwendig, sich vor Einleitung der Erstickung von der Reaktion des Präparates zu überzeugen und die O-Entziehung nicht länger fortzusetzen, als zur Erzielung einer deutlichen Säurebildung erforderlich ist. Bei Beobachtung dieser Vorsichtsmaßregeln läßt sich einwandfrei feststellen, daß die Erstickungssäure auch in Narkose bei O-Zufuhr verschwindet, wie dies die beiden folgenden als Beispiele angeführten Versuchsprotokolle zeigen:

1. Das in der gewöhnlichen Weise präparierte Rückenmark wird

$9^h 40'$ in NaCl-Lösung gebracht, durch die Sauerstoff durchgeleitet wird.

$10^h 45'$ Das Präparat ist gut erregbar. Die Reaktionsprüfung ergibt mit gewöhnlichem Lackmuspapier eine schwache Rötung, mit Lackmuspapier, das mit $^n/_{200}$-NaOH befeuchtet ist, keine Rötung. Das Präparat wird in NaCl-Lösung gebracht, die 5 Vol.-% Alkohol enthält.

$10^h 52'$ Beginn der Stickstoffdurchleitung.

$11^h 42'$ Nach 50 Minuten dauernder O-Entziehung ergibt die Reaktionsprüfung mit Lackmuspapier, das mit $^n/_{200}$-NaOH befeuchtet ist, eine kräftige Rötung. Hierauf wird Sauerstoff durchgeleitet.

$1^h 25'$ Die erneute Reaktionsprüfung des (dauernd völlig unerregbaren) Präparates ergibt mit alkalischem Lackmuspapier keine Rötung, mit gewöhnlichem Lackmuspapier eine schwache Rötung, also das gleiche Verhalten wie vor der Erstickung. In gewöhnlicher O-haltiger NaCl-Lösung kehrt die Erregbarkeit wieder zurück.

2. Gewöhnliches Rückenmarkpräparat kommt

$9^h 55'$ in O-gesättigte NaCl-Lösung.

$10^h 50'$ Gut erregbar. Reaktionsprüfung: gewöhnliches Lackmuspapier gibt mäßige, mit $^n/_{200}$-NaOH befeuchtetes Lackmuspapier minimale Rötung. Das Präparat wird in NaCl-Lösung gebracht, die 1 Gew.-% Urethan enthält.

$10^h 52'$ Beginn der Stickstoffdurchleitung.

$11^h 47'$ Nach 55 Minuten dauernder O-Entziehung ergibt die Prüfung mit alkalischem Lackmuspapier deutliche Rötung. Hierauf wird Sauerstoff durchgeleitet.

$1^h 30'$ Die Reaktionsprüfung des (dauernd völlig unerregbaren) Präparates ergibt mit alkalischem Lackmuspapier keine, mit gewöhnlichem Lackmuspapier eine minimale Rötung, mithin eine geringere Säuerung als vor Einleitung der Erstickung. In gewöhnlicher O-NaCl-Lösung kehrt die Reflexerregbarkeit wieder zurück.

4.

Deutung der Ergebnisse. 1. Die Tatsache, daß bei O-Entziehung die Säurebildung alsbald einsetzt und bereits zu einer Zeit, in der die Erregbarkeit noch gut erhalten ist, deutlich nachgewiesen werden kann, stellt einen neuen Beweis für die Richtigkeit der Auffassung dar, daß das Erhaltenbleiben der Erregbarkeit in der ersten Zeit nach Aufhören der O-Zufuhr nicht auf dem Vorhandensein irgendwelcher Depots von aufgespeichertem Sauerstoff beruht, sondern auf anoxybiotischen, mit Säurebildung verbundenen Prozessen[1]). Denn wenn nach Aufhören der O-Zufuhr die Oxydationsprozesse mit Hilfe aufgespeicherten Sauerstoffs weitergeführt würden, dann wäre auch keine Veranlassung zu einer Ansammlung von Säure gegeben.

2. Da diese Ansammlung von Säure bei O-Entziehung in gleicher Weise auch in Narkose stattfindet, so folgt daraus, daß die zur Erstickung führenden Stoffwechselvorgänge durch die Narkose anscheinend nicht nennenswert beeinflußt werden, eine Schlußfolgerung, die völlig übereinstimmt mit den Beobachtungen von Bondy[2]) am Zentralnervensystem und von Fröhlich[3]) am peripheren Nerven, nach denen die Erstickung bei O-Entziehung auch in Narkose eintritt, und zwar annähernd in der gleichen Zeit wie ohne dieselbe.

3. Da die Narkose somit die Säurebildung bei Erstickung nicht verhindert, so führt die Tatsache, daß bei O-Zufuhr in Narkose keine Anhäufung von Säure stattfindet, zu dem zwingenden Schluß, daß die Narkose weder auf einer Behinderung der Oxydationsprozesse beruhen, noch auch bei längerem Bestande zu einer Erstickung führen kann.

4. Die bei Erstickung angesammelte Säure verschwindet bei O-Zufuhr auch in Narkose. Da wir nun aus früheren Untersuchungen[4]), die ja den Ausgangspunkt der ganzen Er-

---

[1]) Vgl. H. Winterstein, Über den Mechanismus der Gewebsatmung. Zeitschr. f. allg. Physiol. 6, 315, 1907.

[2]) O. Bondy, Untersuchungen über die Sauerstoffaufspeicherung in den Nervenzentren. Zeitschr. f. allg. Physiol. 3, 180, 1904.

[3]) Fr. W. Fröhlich, Zur Kenntnis der Narkose des Nerven. Zeitschr. f. allg. Physiol. 3, 75, 1904.

[4]) H. Winterstein, Zur Kenntnis der Narkose. Zeitschr. f. allg. Physiol. 1, 19, 1902.

stickungstheorie der Narkose gebildet haben, wissen, daß erstickte Nervenzentren sich in Narkose trotz O-Zufuhr nicht erholen können, so muß aus dem Umstande, daß die Narkose die oxydative Entfernung[1]) der Erstickungssäure nicht verhindert, wohl geschlossen werden, daß nicht diese Ansammlung von Säure, sondern damit einhergehende andersartige Vorgänge das Verschwinden der Erregbarkeit bedingen.

Wie ohne weiteres ersichtlich, stehen alle diese Resultate in vollster Übereinstimmung mit den eingangs erwähnten Schlußfolgerungen, die aus der direkten Untersuchung des Einflusses der Narkose auf den O-Verbrauch des Froschrückenmarks gewonnen worden waren.

5.

Die Annahme, daß die Narkose auf einer Behinderung der Oxydationsprozesse beruhe, hatte Verworn zu der Vermutung geführt, daß infolgedessen bei länger dauernder Narkose trotz O-Zufuhr allmählich ein Zustand von Erstickung eintreten müsse[2]), und Heaton[3]) hat am Nerven eine Reihe von Versuchen ausgeführt, die er als Beweise für die Richtigkeit dieser Vorstellung ansah, zu deren Gunsten auch mir einige gelegentlich am Froschrückenmark angestellten Experimente zu sprechen schienen[4]).

Heaton fand, daß ein Nerv, der bei Anwesenheit von Sauerstoff längere Zeit hindurch narkotisiert wurde, nach Aufhebung der Narkose in einem O-freien Medium nur ungefähr

---

[1]) Mit der Bezeichnung „oxydative Entfernung" soll lediglich die Tatsache zum Ausdruck gebracht werden, daß das Verschwinden der angesammelten Säure Oxydationsprozesse zur Voraussetzung hat, nicht aber, daß die Säure selbst durch Oxydation entfernt wird. Es ist sehr wohl denkbar, daß es sich auch hier um eine an den Ablauf von Oxydationsprozessen geknüpfte Synthese der Säure zum Ausgangsmaterial, dem „Acidogen", handelt, wie dies durch die neueren Untersuchungen, insbesondere von Fletcher, Hill und Embden, für den Muskel fast als sicher erwiesen angesehen werden kann.

[2]) Daß eine derartige Annahme in Wahrheit vom Standpunkte der Erstickungstheorie der Narkose zu unlöslichen Widersprüchen führen müßte, habe ich bereits an anderer Stelle dargelegt (vgl. II. Mitt., S. 99).

[3]) F. B. Heaton, Zur Kenntnis der Narkose. Zeitschr. f. allg. Physiol. **10**, 53, 1909.

[4]) Vgl. II. Mitt., S. 98.

den gleichen Erregbarkeitsgrad aufwies wie ein Kontrollnerv, dem dauernd der Sauerstoff entzogen worden war, und ich beobachtete, daß ein längere Zeit hindurch in O-gesättigter Lösung narkotisiertes Rückenmark sich in einer O-freien Lösung gar nicht oder nur unvollständig erholte. Da nun die im vorangehenden mitgeteilten Versuche ergeben hatten, daß auch länger dauernde Narkose bei O-Zufuhr nicht zu einer Ansammlung von Säure, mithin auch nicht zu einer Erstickung führt, so ergab sich hier ein Widerspruch, der eine Aufklärung erforderte und mich veranlaßte, das Verhalten der Erregbarkeit nach lange Zeit fortgesetzter Narkose nachzuprüfen, zumal weder meine eigenen noch die Versuche von Heaton bei näherer Überlegung sich als beweiskräftig erwiesen. Da nämlich beim isolierten Rückenmark eine geraume Zeit vergeht, bis eine vollständige Erholung von der Narkose eingetreten ist, besonders wenn diese längere Zeit hindurch fortgesetzt wurde, so konnte die mangelhafte Erholung nach einer solchen in einer O-freien Lösung einfach darauf beruhen, daß die noch von den Überresten der Narkose herrührende und die durch die O-Entziehung inzwischen bereits eingetretene Herabsetzung der Erregbarkeit sich summierten. Ähnliche Betrachtungen gelten aber auch für die Versuche von Heaton.

Heaton betont selbst die Schwierigkeit, einen Nerven längere Zeit mit Äther zu narkotisieren, ohne eine dauernde irreparable Schädigung desselben herbeizuführen. Er verfuhr in der Weise, daß der Nerv durch einen Äther-Luftstrom in Narkose gehalten wurde. Zur Prüfung der Erregbarkeit wurde von Zeit zu Zeit dieser Äther-Luftstrom zunächst durch einen Äther-Stickstoffstrom und dann zur Aufhebung der Narkose durch einen Strom reinen Stickstoffs verdrängt. Der Nerv war mithin jedesmal längere Zeit hindurch O-Mangel ausgesetzt, der für sich allein bereits eine Herabsetzung der Erregbarkeit bedingen mußte; die Prüfung der letzteren konnte überdies nur dann beweisend sein, wenn der Nerv Zeit gehabt hatte, sich völlig von der vorangegangenen Narkose zu erholen. Von 25 Versuchen, die nach Angabe des Autors zu brauchbaren Resultaten geführt haben sollen, sind nur 2 Protokolle mitgeteilt, die also wohl zu den bestgelungenen Versuchen gehört haben dürften. In dem einen Versuch war die Erregbarkeit des Narkosenerven von Anfang an um 70 mm R.A. niedriger als die des einfach erstickten Kontrollnerven. Die Luftnarkose dauerte insgesamt 65 Minuten, die Gesamtdauer des Versuches bis zu Beginn der Erholung betrug 115 Minuten, so daß auch dieser Nerv durch 115 — 65 = 50 Minuten völliger O-Entziehung ausgesetzt war. Nach einer O-Entziehung von 50 Minuten war

bei dem Kontrollnerven die Erregbarkeit um 80 mm R.A. gesunken, so daß bereits hieraus, ohne jede Beeinflussung durch die Narkose, für den Versuchsnerven eine um $70+80=150$ mm R.A. höhere Reizschwelle resultierte. (Die Unterbrechung der Erstickung durch zeitweise O-Zufuhr konnte nicht von Einfluß sein, weil ja, wie schon erwähnt, O-Zufuhr in Narkose keine Erholung bewirkt.) Aus dem Protokoll ist ersichtlich, daß die Zeit zwischen der Aufhebung der Luftnarkose und der Prüfung der Erregbarkeit nur 15 Minuten betrug, von denen noch einige auf die Verdrängung des Äther-Luftstromes durch einen Äther-Stickstoffstrom entfallen mußten, so daß dem Nerven zur Erholung von der Narkose nicht viel mehr als 10 Minuten zur Verfügung standen. Nirgends ist von einer Kontrolle die Rede, die erwiesen hätte, daß diese Erholungszeit ausreichend war. Aus den mit der gleichen Versuchsanordnung angestellten Versuchen von Fröhlich (l. c.) geht hervor, daß die völlige Erholung selbst bei rascher Verdrängung des Äthers durch einen intensiven Gasstrom 30 bis 40 Minuten dauern kann. Wenn also der narkotisierte Nerv schließlich nach 2 Stunden bei demselben Erregbarkeitsgrade angelangt war wie der erstickte, so konnte dies sehr wohl darauf beruhen, daß er noch unter dem Einfluß der Narkose und außerdem schon unter dem Einfluß der durch die O-Entziehung bedingten Erstickung stand. Ähnlich liegen die Verhältnisse auch in dem zweiten Versuche. Die Beweiskraft dieser Experimente ist daher eine sehr problematische.

Wie schon erwähnt (II. Mitt., S. 97), hat bereits Bondy (l. c.) einen Versuch an den Nervenzentren ausgeführt, der gegen die Annahme einer allmählichen Erstickung in Narkose sprach, indem er nach längerer Durchspülung eines Frosches mit alkoholhaltigem Blut bei Durchströmung mit O-freier Lösung eine prompte Erholung beobachtete. Doch war in diesem Versuche die Narkose vielleicht nicht lange Zeit genug fortgesetzt. Ich habe daher einige neue Versuche mit der Durchspülungsmethode angestellt, die wegen der Schnelligkeit, mit der hierbei die Aufhebung der Narkose erfolgt, allein zur Entscheidung der Frage geeignet schien. Als Narkoticum wurde Urethan gewählt, das einmal wegen seiner Unschädlichkeit und dann auch deshalb vor dem Alkohol den Vorzug verdiente, weil es im Gegensatz zu diesem in der narkotischen Konzentration in der Tat eine Herabsetzung der Oxydationsprozesse bewirkt (vgl. II. Mitt.) und mithin einen allmählichen Eintritt einer Erstickung noch am ehesten erwarten ließ.

Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß die Frösche von der Aorta aus durch eine erfahrungsgemäß zur Herbeiführung der Erstickung ausreichende Zeit mit einer

O-reichen Kochsalzlösung, die 10% Rinderblut und 1 Gew.-% Urethan enthielt, durchspült wurden. Hierauf wurde die Blutlösung durch eine O-freie NaCl-Lösung von gleichem Urethangehalt verdrängt, und hierauf die Narkose durch Durchspülen mit O-freier NaCl-Lösung aufgehoben. Bei einem Frosch wurde die Narkose 80 Minuten, bei einem zweiten, mit Strychnin vergifteten Frosch 108 Minuten nach Eintritt völliger Unerregbarkeit aufgehoben, und schon nach 4 Minuten im ersten, nach 2 Minuten im zweiten Falle kehrten bei Durchspülung mit O-freier Lösung die Reaktionen wieder zurück, so daß also keinerlei Erstickung feststellbar war.

Da nun die Möglichkeit bestand, daß das Urethan sich vielleicht anders verhält als die übrigen Narkotica, habe ich noch in einigen Experimenten untersucht, ob das Urethan ebenso, wie ich (l. c.) dies seinerzeit für Chloroform, Äther, Alkohol und Kohlensäure festgestellt hatte, die Erholung erstickter Frösche bei O-Zufuhr verhindert. Es ergab sich übereinstimmend, daß dies beim Urethan in ganz der gleichen Weise der Fall ist. Als Beispiel das folgende Versuchsprotokoll:

10^h 52′ Verdrängung des Blutes durch O-freie NaCl-Lösung. Der Frosch wird hierauf liegen gelassen und seine Erregbarkeit von Zeit zu Zeit geprüft.

12^h 07′ Noch schwache Reaktion.

12^h 18′ Reaktionslos.

12^h 27′ Es wird mit der Durchspülung von Urethan-haltiger O-reicher Blut-Kochsalzlösung begonnen, die 25 Minuten lang fortgesetzt wird.

12^h 53′ Verdrängung der Blutlösung und Aufhebung der Narkose durch O-freie NaCl-Lösung.

1^h 03′ Nach 10 Minuten dauernder Durchspülung ist der Frosch noch immer völlig unerregbar. Hierauf wird mit O-reicher Blut-NaCl-Lösung durchspült.

1^h 04′ Leichte Reaktion.

1^h 05′ Beginn der Atmung.

1^h 15′ Überall sind umfangreiche Bewegungen des ganzen Tieres auslösbar.

Um nun schließlich noch festzustellen, ob vielleicht in Narkose zwar nicht so rasch wie bei O-Entziehung, aber doch ganz allmählich ein Zustand von Erstickung eintritt, habe ich noch einige Versuche mit sehr langer Narkosedauer angestellt. Hierzu eignet sich die Durchspülung wegen der mit ihr verbundenen unvermeidlichen Schädlichkeiten nicht. Nun hat vor

kurzem Krogh[1]) mitgeteilt, daß man mit Urethan Frösche tagelang in Narkose erhalten kann, indem man die durch Eintauchen in eine Urethan-Lösung narkotisierten Tiere dann einfach außerhalb des Wassers liegen läßt. Da nun bei tief narkotisierten Fröschen infolge des Stillstandes der Atembewegungen der Gaswechsel nur mehr durch die Haut erfolgen kann, so habe ich die Frösche, um eine ausreichende O-Zufuhr zu sichern, in einer Atmosphäre von reinem Sauerstoff gehalten, aus der die Kohlensäure durch Laugenlösung absorbiert wurde. Der eine Frosch blieb 18 Stunden, der zweite über 45 Stunden, der dritte schließlich über 9 Tage in tiefer Narkose (bei einer Temperatur von 16—18°). Die beiden ersten waren beim Herausnehmen völlig reaktionslos, bei dem dritten, der gleichfalls völlig bewegungslos war und keine Atmung zeigte, waren auf starkes Kneifen minimale Fußbewegungen auslösbar (vermutlich wegen der allmählich erfolgten Ausscheidung des Urethans aus dem Körper). Nach Verdrängung des Blutes durch O-freie Urethan-Kochsalzlösung kehrten bei Aufhebung der Narkose durch Durchspülung mit O-freier NaCl-Lösung bei allen bereits nach 1 bis 2 Minuten Erregbarkeit und spontane Bewegungen zurück.

Durch diese Versuche dürfte mithin bis zur Evidenz erwiesen sein, daß auch eine Tage lang anhaltende Narkose in keiner Weise zu einer Erstickung führt.

6.

Zusammenfassend ergibt sich mithin als übereinstimmendes Resultat der Untersuchung des Sauerstoffverbrauchs, der Säurebildung und der Erregbarkeit der Nervenzentren unter dem Einfluß der Narkose: Eine etwa nachweisbare Herabsetzung der Oxydationsprozesse ist eine sekundäre Erscheinung, die nicht zur Erklärung des Mechanismus der Narkose dienen kann. Die Narkose verhindert weder die bei O-Mangel eintretende Ansammlung noch die bei O-Zufuhr erfolgende Beseitigung saurer Erstickungsstoffe. Die Narkose ist weder eine Er-

[1]) A. Krogh, Ethyl urethane as a narcotic for aquatic animals. Rev. d. ges. Hydrobiol. u. Hydrogr. 7, 42.

stickung, noch führt sie bei längerem Bestehen zu einer solchen. Die Narkose verhindert nicht das Eintreten einer Erstickung infolge von O-Mangel, wohl aber die Wiedererholung von einer solchen bei O-Zufuhr.

Bereits früher (II. Mitt., S. 100) wurde darauf hingewiesen, daß zur Erklärung der Beziehungen zwischen Narkose und Erstickung das Problem des „Ruhestoffwechsels“ herangezogen werden müsse. Es ist vielleicht nicht unangebracht, die damaligen allgemeinen Ausführungen an der Hand speziellerer Vorstellungen weiterzuentwickeln, nicht etwa, um eine Theorie aufzustellen, für die unsere Kenntnisse noch durchaus unzureichend sind, sondern nur um ganz vorläufig eine Denkmöglichkeit zu gewinnen, die vielleicht den Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen bilden kann. Die Tatsache des Ruhestoffwechsels erfordert, wie schon erwähnt, als wahrscheinlichste Erklärung die Annahme, daß der Erscheinung der „Erregbarkeit“ ein dynamischer Gleichgewichtszustand zugrunde liege, der durch Diffusions- oder sonstige physikalische oder chemische Vorgänge ständig gestört, durch den Ruhestoffwechsel, vor allem durch die Oxydationsprozesse immer wieder hergestellt wird.

Nehmen wir nun an, daß dieser dynamische Gleichgewichtszustand, der die Voraussetzung der „Erregbarkeit“ bildet, in einem Oberflächenpotential, einer „physiologischen Polarisation“ der Zelle zum Ausdruck käme, die gemäß der Membrantheorie davon abhinge, daß die Oberflächenschicht auf irgendeine Weise nach Art einer semipermeablen Membran wirke, so ergeben sich zwei Möglichkeiten für eine (reversible) Aufhebung der Erregbarkeit: einmal die Beseitigung der „elektiven Permeabilität“, die gewissermaßen das physikalische Substrat des Oberflächenpotentials bildet, und zweitens die Einstellung der Oxydationsprozesse, die im Zellinnern die Bedingungen für die Entwicklung der Zellpolarisation ständig neu schaffen und so gewissermaßen das chemische Substrat derselben darstellen. — Nehmen wir weiter entsprechend den von Alcock, H. H. Meyer, Höber, Lillie, Loewe u. a. geäußerten Vorstellungen an, daß die Narkose auf irgendeine Weise die elektive Permeabilität reversibel aufhebe, so würde die Narkose nach dem ersten Modus, die bei O-Entziehung auftretende Erstickung nach dem zweiten Modus zu einer Verminderung und schließlichen Beseitigung der physiologischen Polarisation und damit der Erregbarkeit führen. Die Schnelligkeit, mit der diese Verminderung eintritt, wird bei der Narkose von der Schnelligkeit der Oberflächenveränderung und mithin von der Konzentration des Narkoticums, bei der Erstickung von der Geschwindigkeit des Ruhestoffwechsels und mithin von der Körpertemperatur abhängen.

Zugunsten dieser Vorstellungen ließe sich vielleicht anführen, daß nach den Beobachtungen von Beck[1]) der Ruhestrom des Froschrückenmarks tatsächlich sowohl durch Narkose wie durch Erstickung abge-

[1]) A. Beck, Über elektrische Erscheinungen am Zentralnervensystem des Frosches. Arch. f. d. ges. Physiol. 155, 461, 1914.

schwächt wird (wie dies auch bei anderen Organen der Fall ist), während, wie von Baglioni[1]) zuerst festgestellt und von Beck bestätigt wurde, die Strychninvergiftung eine Steigerung desselben hervorruft, was auf einen Parallelismus zwischen Erregbarkeit und Zellpolarisation hinweist. Die mannigfachen Analogien, die die Erscheinungen der Narkose und jene des O-Mangels aufweisen[2]), würden sich darauf zurückführen lassen, daß ihnen beiden der gleiche Zustand verminderter Zellpolarisation zugrunde liegt, der freilich in beiden Fällen auf ganz verschiedene Weise zustande käme, bei der Narkose durch die Änderung der Beschaffenheit der Grenzfläche, bei der Erstickung durch die Störung der im Zellinneren sich abspielenden Vorgänge. Nehmen wir schließlich noch an, daß diese letzteren in der Narkose in mehr minder unveränderter Weise weitergehen, so erklärt sich die Tatsache,

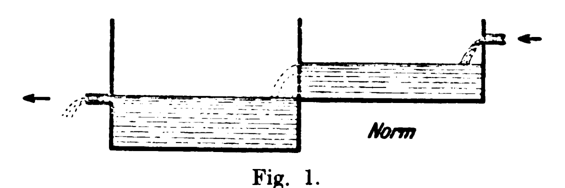


Fig. 1.

daß auch in der Narkose bei O-Mangel eine Erstickung eintritt, während umgekehrt die erstickte Zelle sich trotz O-Zufuhr in Narkose nicht zu erholen vermag, weil die veränderte Grenzflächenbeschaffenheit eine neuerliche „Aufladung" nicht zuläßt.

Ich möchte das Gesagte durch ein Bild veranschaulichen: Denken wir uns das Oberflächenpotential dargestellt durch die Niveaudifferenz

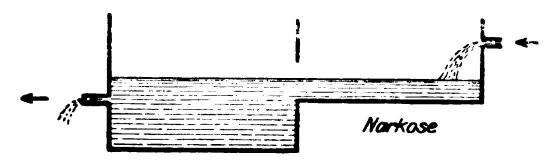


Fig. 2.

zweier in einen Stromlauf eingeschalteter Schleusenkammern, deren obere das Zellinnere, deren untere die Umgebung bedeuten soll. Die „elektive Permeabilität" der Grenzfläche würde versinnbildlicht durch die Öffnungen eines Schleusentores, das sich zwischen den beiden Kammern befindet, deren Füllung durch einen Zu- und Ablauf (Ruhestoffwechsel) konstant erhalten wird (Fig. 1, Norm). Das Öffnen des Schleusentores

[1]) S. Baglioni, Sind die tätigen Ganglienzellen des Zentralnervensystems der Sitz elektromotorischer Kräfte? Centralbl. f. Physiol. 19, 345, 1905.

[2]) Vgl. H. Winterstein, Beiträge zur Kenntnis der Narkose. I. Mitt. Diese Zeitschr. 51, 143, 1913.

(Aufhebung der elektiven Permeabilität) wird eine Beseitigung der Niveaudifferenz zwischen den beiden Kammern (Aufhebung der Erregbarkeit) nach sich ziehen (Fig. 2, Narkose). Das gleiche wird auf anderem Wege auch dadurch bewirkt werden, daß infolge Absperrung des Zuflusses (O-Entziehung) die obere Kammer allmählich leerläuft (Fig. 3, Erstickung). Sowohl bei Schließung des Schleusentores im ersteren Falle, wie bei Freigabe des Zuflusses im zweiten Falle, wird eine Wiederherstellung des

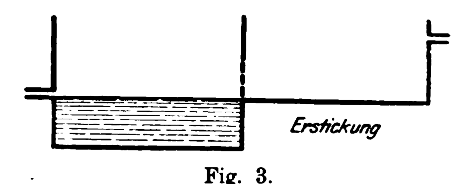


Fig. 3.

normalen Verhaltens erfolgen (Aufhebung der Narkose, Erholung von der Erstickung). — Das Leerlaufen der oberen Kammer bei Absperrung des Zuflusses wird offenbar auch dann (in Fig. 2) eintreten, wenn durch vorangegangene Öffnung des Schleusentores die Niveaudifferenz beseitigt wurde (Erstickung in Narkose). — Wird aber nach Leerlaufen der oberen Kammer (infolge Absperrung des Zuflusses) das Schleusentor geöffnet, so kann, so lange dieses offen bleibt, auch bei Freigabe des Zuflusses keine Wiederauffüllung erfolgen, weil das zuströmende Wasser in gleichem Maße wieder abfließt (Unmöglichkeit einer Erholung erstickter Zellen in Narkose trotz O-Zufuhr).

Vergleichende Untersuchungen über die Giftigkeit der arsenigen Säure und Arsensäure.

Von

Georg Joachimoglu.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 16. März 1915.)

Mit 5 Figuren im Text.

Die Tatsache, daß die arsenige Säure und ihre Salze auf die verschiedenen Organismen gilftiger wirken als die Arsensäure und die entsprechenden Salze, ist von vielen Forschern behauptet worden.

Sieht man sich die experimentellen Daten, die zu dieser Anschauung geführt haben, näher an, so wird man sich wundern, daß absolut exakte Versuche, die einen einwandfreien Beweis für die genannte Tatsache darstellen, bis jetzt nur vereinzelt vorliegen.

Dabei ist die Zahl der Arbeiten, die sich damit befassen, nicht gering.

Die meisten der Autoren haben es versäumt, den verschiedenen Arsengehalt in den Verbindungen des drei- und fünfwertigen Arsens zu berücksichtigen. So berichtet Saikowsky[1]), daß die Wirkungen der Arsensäure auf den Organismus nicht so heftig sind wie die der arsenigen. „Kaninchen, die 0,02 g pulverisierte arsenige Säure 2 bis 3 Tage lang erhielten, starben beim Gebrauche dieser Dosen am 3. oder 4. Tage; während Kaninchen, denen täglich 0,02 g Arsensäure eingegeben wurde, erst am 6. oder 8. Tage starben." Es wird dabei vollkommen außer acht gelassen, daß die Verbindung As_2O_3 theoretisch 75,7 % und die Verbindung $2\,H_3AsO_4 . H_2O$ nur 49,6 % As enthält, so daß das Kaninchen, das 0,02 g Arsensäure bekam, in Wirklichkeit viel weniger Arsen erhielt, als das mit der gleichen Dosis arseniger Säure behandelte. Es kann somit aus diesen Versuchen, die verschiedene Giftigkeit der arsenigen Säure und Arsensäure nicht als bewiesen erachtet werden. Es sei gleich bemerkt, daß die verschiedenen, in den Handel kommenden Präparate

---

[1]) Saikowsky, Über die Fettmetamorphose der Organe nach innerlichem Gebrauch von Arsenik, Antimon- und Phosphor-Präparaten. Virchows Archiv 34, 73.

der arsenigen Säure und Arsensäure keineswegs den oben genannten Arsengehalt aufweisen. Je nach dem Reinheitsgrad nähern sich die Zahlen, die man bei quantitativen Analysen erhält, der Theorie. Es muß verlangt werden, daß bei derartigen Untersuchungen auch nicht der theoretische Arsengehalt als maßgebend betrachtet wird, sondern der auf experimentell-analytischem Wege ermittelte. Erst dann ist man sicher, einwandfreie Resultate zu erzielen. v. Schroff jun.[1]) hat die Versuche Saikowskys wiederholt. Er injizierte Kaninchen vom gleichen Körpergewicht subcutan 0,2 g Natriumarsenit bzw. Kaliumarseniat und beobachtete, daß das Kaninchen, das Natriumarsenit erhielt, nach 36 Minuten starb, während das andere 2 Stunden lang am Leben blieb. Was oben von den Saikowskyschen Versuchen gesagt worden ist, gilt im selben Umfange auch für die Versuche Schroffs. W. Marmé[2]) hat den verschiedenen Arsengehalt der untersuchten Arsenverbindungen berücksichtigt und einwandfreie Versuche geliefert. Ob er die betreffenden Arsenverbindungen analysiert hat, gibt er nicht an. Für arsenige Säure ist der mitgeteilte Arsengehalt 75,75 % und für Arsensäure 65,22 %.

Demnach handelt es sich wohl nicht um Arsensäure, sondern um Arsenpentoxyd. Marmé nahm von beiden Verbindungen entweder gleiche Mengen Arsen enthaltende oder solche Dosen, deren Arsengehalt zugunsten der Arsensäure ausfiel. Sie wurden in gelöster Form Kaninchen in den Magen gebracht oder subcutan injiziert. Es werden auch Versuche mitgeteilt, wo das Gift in die Vena jugularis oder cruralis injiziert und der Blutdruck registriert wurde. Bei allen drei Applikationsweisen tötete die arsenige Säure die Tiere viel rascher als die Arsensäure. Dosen von Arsensäure, die den Blutdruck kaum beeinflussen, rufen bei intravenöser Injektion entsprechender Mengen Arsensäure ein Sinken des Blutdrucks um 66 bis 74 mm Hg. Es scheint, daß diese Arbeit von Marmé bei späteren Untersuchern wenig Beachtung gefunden hat. Ferner machen M. Nencki und N. Sieber[3]) gelegentlich ihrer Untersuchungen über die Oxydation des Benzols zu Phenol, die Angabe, daß bei Arsensäure die Vergiftung eine leichte war, während die arsenige Säure den Tod des Tieres herbeiführte. Die Versuchstiere bekamen subcutan Benzol und arsenigsaures, bzw. arsensaures Kalium.

Bei Fröschen haben S. Ringer und H. Sainsbury[4]) die Beobachtung gemacht, daß bei subcutaner Injektion die arsenige Säure giftiger

[1]) v. Schroff jun., Über den Wert des löslichen Eisenoxydsaccharats gegen arsenige Säuren und über die giftigen Wirkungen der arsenigsauren und arsensauren Alkalien. Neues Repertorium der Pharmazie **23**, 618.

[2]) W. Marmé, Vergleichende Versuche über die giftige Wirkung der arsenigen Säure und der Arsensäure. Nachrichten von der K. Gesellschaft der Wissenschaften aus dem Jahre 1875, Göttingen, S. 614.

[3]) Arch. f. d. ges. Physiol. **31**, 330.

[4]) S. Ringer and H. Sainsbury, Observations on the Physiological and Therapeutic action of the element Arsenic in the form of Arsenite and Arseniate. The British Medical Journal 2, 1134 1193, 1882.

wirkt als die Arsensäure. Sie injizierten Temporarien unter die Rückenhaut. Lösungen von arseniger Säure (1% As_2O_3), Natriumarsenit (1% As) und Natriumarseniat (1% As). Bei der Injektion von Natriumarseniat stellten sich nach 3 bis 6 Stunden Lähmungserscheinungen ein, während Natriumarsenit dieselbe Wirkung innerhalb 40 bis 45 Minuten hervorrief. Sie beschreiben auch Versuche am isolierten Froschherzen, wo sie ebenfalls die höhere Giftigkeit der arsenigen Säure festgestellt haben. Die Technik dieser Herzversuche, die sehr kurz geschildert werden, ist leider aus der Originalarbeit nicht ersichtlich.

Die höhere Giftigkeit der arsenigen Säure ist auch sowohl bei niederen wie auch höheren Pflanzen beobachtet worden, so berichtet Löw[1], daß eine 0,1%ige Lösung von Kaliumarseniat von Algen (Spyrogyra) vertragen wird, während Kaliumarsenit die Algen nach 6 Tagen tötet. Er behauptet ferner, daß für Spaltpilze die Giftigkeit arsensaurer und arsenigsaurer Salze die gleiche ist. Es sei noch die Arbeit W. Knops[2]) erwähnt, der beobachtet hat, daß bewurzelte Maispflanzen in einer Nährlösung, die Kaliumarseniat enthält, sich sehr gut entwickeln und normale Samen bringen. Demgegenüber ist arsenige Säure ein intensives Gift für diese Pflanzen.

In neuerer Zeit hat sich H. Kionka[3]) mit dieser Frage beschäftigt. Er injizierte Kaninchen subcutan arsenige Säure und Arsensäure in Form ihrer Natriumsalze und fand keinen Unterschied in der Giftigkeit dieser Substanzen. Es liegt aber die Möglichkeit vor, daß bei der Berechnung des Arsengehalts des arsensauren Natriums ein Irrtum vorliegt. Während man nämlich auf Seite 491 l. c. die Angabe findet, daß kristallisiertes Natriumarseniat (E. Merck) angewandt worden ist, gibt der Autor demselben die Formel Na_2HAsO_4, ohne die sieben Moleküle Krystallwasser, die das krystallisierte Präparat enthält, zu berücksichtigen.

In den Tabellen sind leider die injizierten Flüssigkeitsmengen nicht angegeben, deshalb können die Zahlen für die injizierten As-Mengen nicht kontrolliert werden. Kionka gibt auf der folgenden Seite an, daß eine 1%ige Natriumarseniatlösung 0,403% Arsen enthält, ein Arsengehalt, der nur dem trockenen Natriumarseniat zukommt. Falls er also die

---

[1]) O. Loew, Arch. f. d. ges. Physiol. **32**, 112 und **40**, 444, und Natürliches System der Giftwirkungen. München **1893**, S. 21.

[2]) W. Knop, Über die Aufnahme verschiedener Substanzen, welche nicht zu den Nährstoffen gehören. Berichte der math.-phys. Klasse der Kgl. Sächs. Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig **1885**, **15** usw.

[3]) H. Kionka, Archiv internat. de Pharmacodynamie **21**, 489, 1911.

angewandten Lösungen nicht analysiert hat, worüber keine Angabe zu finden ist, so haben die injizierten Mengen nicht so viel Arsen enthalten, wie in den Tabellen angegeben ist. Ebenfalls ist zu berücksichtigen, daß die injizierten Lösungen nicht neutralisiert waren. Die arsenige Säure wurde in Natronlauge bei schwach alkalischer Reaktion gelöst. Inwieweit die Alkalescenz dieser Lösung mit der Alkalescenz der wässerigen Natriumarseniatlösung übereinstimmte, ist nicht angegeben. Ferner hat Kionka in Lösungen von Natriumarseniat und arseniger Säure, die in Natronlauge gelöst wurde, vom selben Arsengehalt Frösche gehalten und beobachtet, daß die Frösche in einer Lösung von Arseniat länger am Leben bleiben als in einer Lösung von arseniger Säure. Bei einer solchen Versuchsanordnung kann aber leicht durch bakterielle Verunreinigungen eine Reduktion der Arsensäure in arsenige Säure stattfinden und dementsprechend sich die Giftigkeit verändern.

Eine solche Reduktion kann ziemlich schnell vor sich gehen, wenn genügend organische Substanz vorhanden ist. Deshalb ist auch eine andere Versuchsreihe, bei der die Frösche täglich in frisch bereitete Lösungen gebracht wurden, nicht ganz beweiskräftig. Eine chemische Prüfung der Lösungen auf arsenige Säure und Arsensäure ist bei den kleinen As-Mengen, um die es sich dabei handelt, kaum durchführbar, und es kann aus seinem negativen Befund kein Schluß auf die Abwesenheit der arsenigen Säure gezogen werden. Auch ähnliche Versuche mit Opalinen, die Kionka angestellt hat, sind nicht einwandfrei; denn es können aus dem Mastdarm der Frösche mit den Opalinen auch Mikroorganismen in die Arsenlösungen gebracht werden, die ebenfalls eine Reduktion der Arsensäure herbeiführen können. Ohne deshalb den Kionkaschen Versuchen jede Besweiskraft absprechen zu wollen, möchte ich sie doch aus den angeführten Gründen für einen exakten experimentellen Beweis nicht verwerten.

Wenn nun auch aus den angeführten Arbeiten mit großer Wahrscheinlichkeit hervorgeht, daß die Arseniate an Wirksamkeit hinter den Arseniten zurückstehen, so schien es mir doch angezeigt, mit Hilfe einiger neuer Versuchsanordnungen den Gegenstand erneut zu untersuchen.

Eigene Untersuchungen.

Die höhere Giftigkeit der arsenigen Säure läßt sich sehr leicht demonstrieren, wenn man Lösungen von Arseniten und Arseniaten von gleichem Arsengehalt auf isolierte Organe einwirken läßt. Man bekommt je nach der Art des angewandten Organs mehr oder weniger eklatante Unterschiede. Injiziert man Kaninchen intravenös neutrale Lösungen der genannten Säuren, so sind ebenfalls Unterschiede wahrzunehmen, allerdings nicht so große, wie bei der Applikation auf isolierte Organe. Bei der subcutanen Applikation ist die Resorption möglicherweise eine verschiedene, deshalb ist die Injektion in die Blutbahn vorzuziehen.

Die Lösung der arsenigen Säure wurde in der Weise hergestellt, daß Arsentrioxyd (As_2O_3) in Natronlauge gelöst und die Lösung nach Zusatz von Phenolphthaleïn mit Schwefelsäure neutralisiert wurde. Durch Auflösen von Natriumarsenit ($NaAsO_2$) in Wasser erhält man ebenfalls eine Lösung, die arsenige Säure enthält. Dieses Salz heißt richtiger Natriummetarsenit, denn es leitet sich ab von der metaarsenigen Säure $As\langle{}^{O}_{OH}$. Theoretisch enthält es 57,68% As. Ein Präparat von **Kahlbaum**, das ich für die folgenden Versuche verwendet habe, enthielt nach zwei übereinstimmenden gravimetrischen Analysen 54,81% As. Man ersieht daraus, daß der theoretische Gehalt mit dem wirklichen nicht übereinstimmt. Für die Berechnungen ist natürlich nur die zweite Zahl maßgebend gewesen.

Zur Herstellung der Arsensäurelösung benutzte ich das Natriumarseniat ($Na_2HAsO_4 . 7H_2O$), das sich in Wasser leicht löst. Es enthält theoretisch 24,02% As. Zwei übereinstimmende gravimetrische Bestimmungen ergaben 24,17% As. Die Lösungen des Natriumarsenits und Natriumarseniats reagieren schwach alkalisch. Sie wurden mit Schwefelsäure neutralisiert.

Intravenöse Injektion.

Gesunden Kaninchen, mit einem Körpergewicht von 1280 bis 1600 g, wurden die entsprechenden Lösungen in die Vena marginalis injiziert.

Die Verhältnisse sind aus den Protokollen ohne weiteres ersichtlich.

Arsenige Säure.

20. XI. 13. K. 13: Gewicht 1600 g. 4,0 mg As pro 1000 g = 6,4 mg As sind enthalten in 1,70 ccm $^{n}/_{10}$-As_2O_3-Lösung. — 11[45] Temp. 38,5°; 11[50] Inj. in die Ohrvene, 12[35] Temp. 37°; 3[00] nachm. Faeces dünnflüssig. 21. XI. Tier befindet sich wohl. 1. XII. Tier ist tot aufgefunden. Totenstarre.

Sektion: Beide Lungen sind stark hyperämisch und entzündet. Magen, Darm, Leber, Nieren, Milz o. B.

---

20. XI. K. 12: Gewicht 1550 g. 6 mg As pro 1000 g. 9,3 mg sind enthalten in 2,48 = 2,5 ccm $^{n}/_{10}$-As_2O_3-Lösung. — 11[15] Temp. 37,9°; 11[20] Inj. in die Ohrvene; 11[35] Temp. 37,6°; 12[35] Temp. 36,2°. 3[00] nachm. Faeces dünnflüssig. Diarrhöe, 6[00] Kaninchen lebt. 21. XI. Tier tot aufgefunden. Totenstarre.

Sektion: Magenschleimhaut stark hyperämisch. Dünndarm ebenfalls. Dünn- und Dickdarm sind mit flüssigem Inhalt gefüllt. Im Cor finden sich Cruorgerinnsel. Lungen beiderseits hyperämisch. Leber ebenfalls.

2. II. 14. K. 18: Gewicht 1380 g. 10 mg As pro 1000 g. 13,8 mg A sind enthalten in 4,498 (4,5) ccm Natriumarsenitlösung (1 ccm = 3,058 mg As). 5[30] Temp. 38,6°; 5[35] Inj. i. V.; 5[45] Temp. 38,3°; 5[55] Temp. 37,5°; 6[05] Temp. 37,8°; 6[10] Temp. 36,7°; 6[13] Tier legt sich auf die Seite. Dyspnoe. 6[14] vereinzelte Atemzüge. 6[15] Reflexe erloschen, tot.

Sektion: Allgemeine Hyperämie der Bauchorgane. Lungen hyperämisch. Milz, Nieren, Leber o. B.

Arsensäure.

28. I. 14. K. 16: Gewicht 1400 g. 6 mg As pro 1000 g. 8,4 mg As sind enthalten in 3,5 ccm Natriumarseniatlösung (1 ccm = 2,384 mg As). 3[00] Temp. 38,8°; 3[05] Inj. i. V.; 3[15] Temp. 38,7°; 4[00] Temp. 39,1°; 4[30] Temp. 39°. 29. I. Tier befindet sich wohl. 31. I. Tier lebt, befindet sich wohl. 1. II. Tot aufgefunden. Muskelstarre.

Sektion: Beide Lungen, verwiegend die linke, sind stark hyperämisch. Das Gewebe überall noch lufthaltig. Geringe Hyperämie der Bauchorgane, sonst nichts Auffälliges.

2. II. K. 17: Gewicht 1280 g. 10 mg As pro 1000 g. 12,8 mg As sind enthalten in 5,37 (5,4) ccm Natriumarseniatlösung. 3[35] Temp. 38,6°; 3[40] Inj. i. V.; 3[50] Temp. 37,8°; 4[05] Temp. 37,7°; 4[40] Temp. 37,3°; 6[25] Temp. 36,9°. 3. II. Tier ist tot. Muskelstarre.

Sektion: Kein bemerkenswerter Befund.

Kaninchen 13, das 4,0 mg As pro Kilo Körpergewicht in Form von arseniger Säure erhielt, zeigte Temperaturabfall und Diarrhöe, während beim Kaninchen 16, das 6,0 mg As in Form von Arsensäure erhielt, diese Symptome vollkommen fehlten. Kaninchen 12, mit 6,0 mg As in Form von arseniger

Tabelle I.

Arsenige Säure.

Nr. des Tieres	Gewicht g	Injiz. Volumen ccm	Injiz. As-Menge mg	pro kg mg	Temperatur vor der Injektion °C	Temperatur nach d. Injektion °C	Resultat
12	1550	2,5	9,3	**6,0**	**37,9**	**36,2**	Tot nach 7 bis 20 Std.
13	1600	1,7	6,4	4,0	38,5	37,0	Tot nach 11 Tagen.
18	1380	4,5	13,8	**10,0**	38,6	36,2	Tot in 30 Minuten.
			Arsensäure.				
16	1400	3,5	8,4	**6,0**	**38,8**	**39,1**	Tot nach 3 Tagen.
17	1280	5,4	12,8	**10,0**	38,6	36,9	Tot nach 5 bis 18 Std.

Säure, zeigte ebenfalls Temperaturabfall und Diarrhöe und starb nach 7 bis 20 Stunden. Diesem Tier entspricht Kaninchen 17, das 10 mg As in Form von Arsensäure erhielt. Es zeigte ebenfalls Temperaturabfall und starb nach 5 bis 18 Stunden. Demnach verhalten sich, bei dieser Versuchsanordnung 10 mg As in der fünfwertigen Form, wie 6 mg in der dreiwertigen. Eine Dosis von 10 mg As, pro Kilo Körpergewicht, in Form von arseniger Säure, tötet das Tier innerhalb 30 Minuten. (Kaninchen 18.)

Es geht somit aus diesen Versuchen hervor, daß bei der intravenösen Applikation die arsenige Säure giftiger wirkt als die Arsensäure.

Versuche am isolierten Froschherzen.

Zu diesen Versuchen wurde das Froschherz in der bekannten Straubschen Versuchsanordnung benutzt. Es wurden ausschließlich männliche Wasserfrösche, sowohl hiesige wie auch ungarische, genommen. Nachdem die normalen Contractionen eine Zeitlang registriert wurden, entnahm ich die Ringerlösung aus der Herzkanüle und ersetzte sie durch die arsenhaltige.

Zur Herstellung der arsenhaltigen Ringerlösung benutzte ich folgende Stammlösungen der obengenannten Arsenpräparate:

$n/_{10}$-As_2O_3-Lösung. 1 ccm = 3,748 mg As.

5,579 g $NaAsO_2$ in 1 l Wasser gelöst. 1 ccm = 3,058 mg As.

9,861 g $Na_2HAsO_4 \cdot 7\,H_2O$ in 1 l Wasser gelöst. 1 ccm = 2,384 mg As.

Wurde in das Herz eine Ringerlösung gebracht, die in 100 ccm ca. 7,5 mg As in Form von arseniger Säure enthielt, so nahm die Contractionshöhe des Herzens allmählich ab, so

daß sie nach 30 Minuten die Hälfte der normalen betrug. Die Frequenz änderte sich nicht. Schließlich resultierte nach 50 Minuten ein diastolischer Stillstand, der auch durch Auswaschen des Herzens mit reiner Ringerlösung nicht aufzuheben war. Stärkere Arsenkonzentrationen (24,5 mg Arsen in 100 ccm) sind etwas giftiger, und man erhält in 20 Minuten den obenerwähnten diastolischen Stillstand. Vgl. Kurve Nr. 1.

Daß das Natriumarsenit auf das isolierte Froschherz in der geschilderten Weise wirkt, war bereits durch die Untersuchungen O. Loewis[1]) bekannt. Loewi benutzte den komplizierteren Williamsschen Apparat. Das Natriumarsenit wurde in wenig Wasser gelöst und der Nährflüssigkeit zugesetzt. Eine Konzentration von 0,02 % Natriumarsenit „führt in etwas mehr

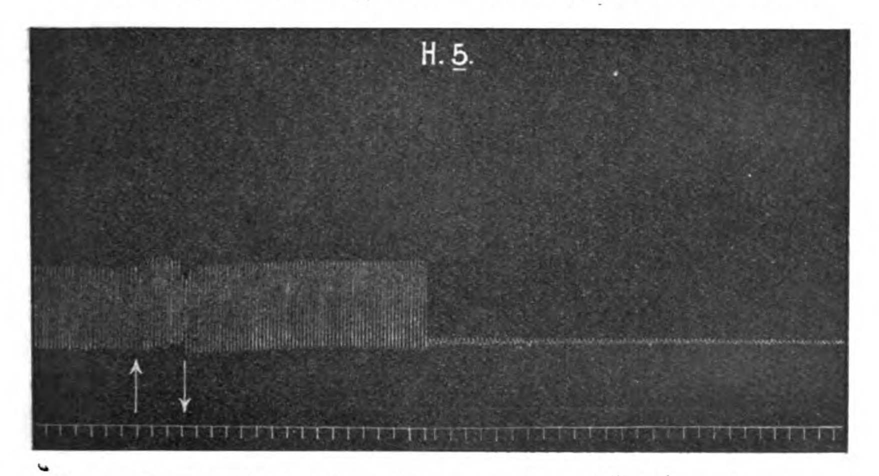


Fig. 1. **Rana esculenta** (Ungarn) 62 g männlich. Vergiftung mit einer Ringerlösung, die in 100 ccm **24,46** mg As in Form von Arsenit enthält. Zwischen ↑ und ↓ wird die arsenhaltige Ringerlösung zugesetzt. Nach 20 **Minuten** Stillstand. Die kleinen Contractionen rühren nicht vom Ventrikel, sondern vom Vorhof her.

als einer halben Stunde zum diastolischen Stillstand". Diese Natriumarsenitkonzentration entspricht einer Arsenkonzentration von 0,0109 %, vorausgesetzt, daß das von Loewi untersuchte Präparat denselben Arsengehalt aufwies, wie das von mir be-

[1]) O. Loewi, Zur quantitativen Wirkung von Blausäure, Arsen und Phosphor auf das isolierte Froschherz. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **38**, 132, 1897.

nutzte. Vergleicht man diesen Versuch mit Versuch Nr. 4 (Tabelle II), so sieht man, daß beide Resultate ziemlich gut übereinstimmen. Bei diesem Versuch erhielt ich bei einer Konzentration von 0,0075 % As in 50 Minuten diastolischen Stillstand. Die nach einer anderen Methode erzielten Resultate Loewis werden hiermit bestätigt.

Das Natriumarseniat verhält sich nun ganz anders. Mit einer Ringerlösung, die Natriumarseniat enthielt, konnte ich

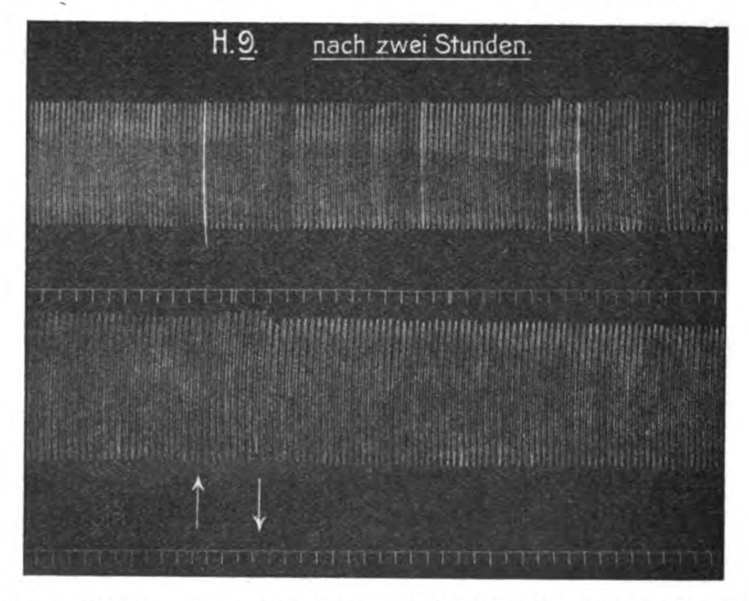


Fig. 2. Rana esculenta (Ungarn) 70 g männlich. Vergiftung mit einer Ringerlösung, die in 100 ccm **38,14** mg Arsen in Form von Arseniat enthält. Zwischen ↑ und ↓ wird die arsenhaltige Ringerlösung zugesetzt. Auch nach 2 Stunden (ebene Kurve) sind kaum irgendwelche Störungen zu beobachten.

überhaupt keinen Stillstand erzielen. Im Versuch Nr. 11 wurde auf das Herz die reine, obenerwähnte Arseniatlösung appliziert und, abgesehen von einigen Störungen im Rhythmus, änderte sich weder die Contractionshöhe noch die Frequenz. Es handelt sich dabei um eine 300 mal stärkere Arsenkonzentration als im Versuch Nr. 4.

Die Versuche sind in Tabelle II zusammengestellt. Stücke der Kurven zweier besonders instruktiver Versuche sind nachstehend wiedergegeben.

Tabelle II.

Nummer des Versuchs	Tierart	Gewicht g	As-Menge in 100 ccm Ringerlösung mg	Die in die Herzkanüle gebrachte As-Menge betrug (0,5 ccm Flüssigkeit) mg	Resultat
			Arsenige Säure.		
1	Rana esculenta	63	1,874 ($^n/_{10}$-As_2O_3)	0,0094	Die Contractionen nehmen nach 30 Min. erheblich ab.
2	Rana esculenta (Ungarn)	55	3,058 ($NaAsO_2$)	0,01529	do.
3	Rana esculenta	59	3,748 ($^n/_{10}$-As_2O_3)	0,01874	Die Contractionen nehmen nach 15 Min. erheblich ab.
4	do.	59	7,496 ($^n/_{10}$-As_2O_3)	0,03748	do.
5	Rana esculenta (Ungarn)	62	24,46 ($NaAsO_2$)	0,1223	Nach 20 Min. Stillstand.
			Arsensäure.		
6	Rana esculenta	40	3,74	0,0187	Nach 2 Std. kaum eine Wirkung festzustellen.
7	do.	45	7,48	0,0374	do.
8	do.	48	14,96	0,0748	do.
9	Rana esculenta (Ungarn)	70	38,14	0,19	do.
10	do.	63	1192,0	5,9	do.
11	do.	62	2384,0	11,92	Einige Störungen im Rhythmus, nach 2 Std. kein Stillstand.

Versuche am isolierten Kaninchendünndarm.

Es wurde die von Magnus[1]) angegebene Methode der Registrierung der Darmbewegungen angewandt. Im Laufe der Zeit ist diese Methode etwas modifiziert worden. Ich will, ohne auf Einzelheiten einzugehen, die Technik kurz skizzieren. Ein 4 bis 5 cm langes Dünndarmstück wurde in ein zylindrisches Glasgefäß von 100 ccm Inhalt gebracht, das sich in einem Wasserbade von 38 bis 38,5° befand. Das Glasgefäß trug ein bis zum Boden reichendes Ansatzrohr, das zur Leitung von Sauerstoff diente. Das Darmstück befand sich in Tyrodelösung von folgender Zusammensetzung; NaCl 8,0, KCl 0,2, $CaCl_2$ 0,2, $MgCl_2$ 0,1, NaH_2PO_4 0,05, $NaHCO_3$ 1,0, Traubenzucker 1,0, dest. Wasser 1000,0.

Die Darmbewegungen wurden auf einen Hebel übertragen, der sie auf einer rotierenden Trommel registrierte.

Wichtig für das Gelingen der Versuche ist die konstante Temperatur des Wasserbades. Man erreicht dies am besten

[1]) R. Magnus, Arch. f. d. ges. Physiol. 102, 123.

mit einem Flüssigkeitsthermoregulator. Ebenfalls ist darauf zu achten, daß ständig Sauerstoff durch die Tyrodelösung perlt.

Nachdem der Darm in das Glasgefäß gebracht wurde, wartete ich 20 bis 30 Minuten, bis er sich vollkommen erholt hatte und die Wellenbewegungen gleichmäßig waren. Es wurden dann vorsichtig entsprechende Mengen Tyrodelösung aus dem Glasgefäß herauspipettiert und durch arsenhaltige Lösung ersetzt. Es wurden dieselben Arsenpräparate benutzt, die ich oben

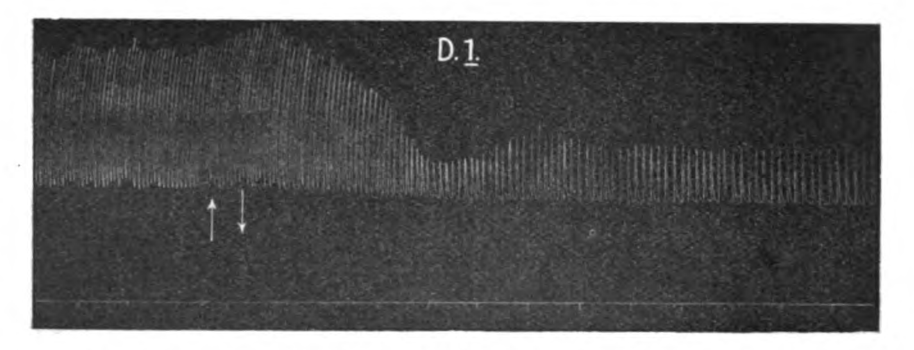


Fig. 3. Zwischen ↑ und ↓ wird die Natriumarsenitlösung zugesetzt. 2,9 mg As in 100 ccm Tyrodelösung. Zeit: 1 Minute.

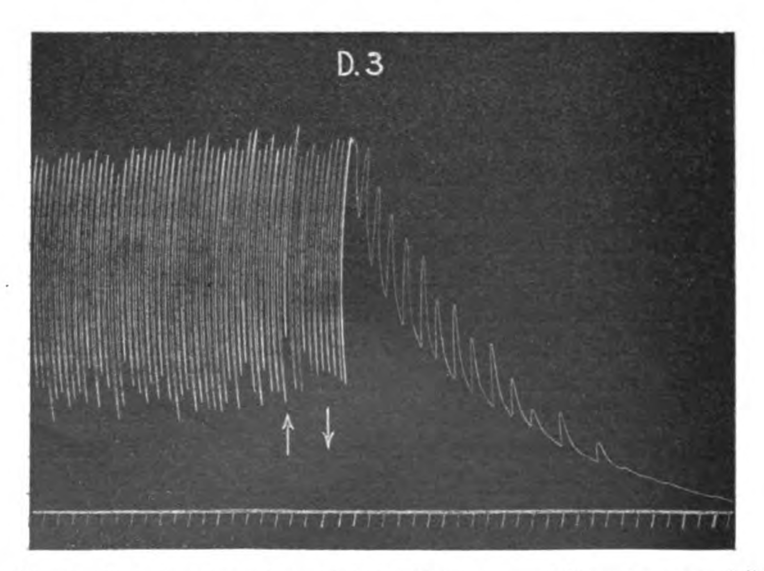


Fig. 4. Zwischen ↑ und ↓ wird die Natriumarsenitlösung zugesetzt. 30,58 mg As in 100 ccm Tyrodelösung. Zeit: 10 Sekunden.

bei den Froschherzversuchen erwähnt habe. Bei einem Gehalt von 2,8 mg Arsen in Form von arseniger Säure in 100 ccm Tyrodelösung nimmt die Höhe der Darmcontractionen bald nach Zusatz des Arsens erheblich ab. Auch die Frequenz verringert sich. Ein Stillstand ist auch nach Ablauf 1 Stunde nicht zu beobachten (vgl. Fig. 3). Bei einem Arsengehalt von 30 mg Arsen in 100 ccm Tyrodelösung stellt sich schon nach 3 Minuten ein vollkommener Stillstand ein (vgl. Fig. 4).

Demgegenüber sind arseniathaltige Tyrodelösungen für den Darm nur in sehr geringem Maße giftig. Vgl. Fig. 5, wo ich bei

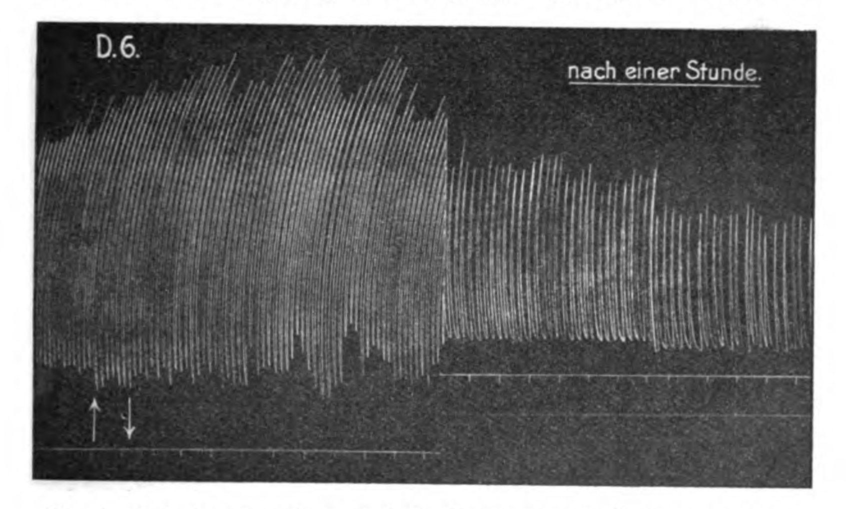


Fig. 5. Zwischen ↑ und ↓ wird die Natriumarseniatlösung zugesetzt. 25,06 mg As in 100 ccm Tyrodelösung. Zeit: 20 Sekunden.

einem Gehalt von 25 mg Arsen in 100 ccm Tyrodelösung nach 20 Minuten eine geringe Abnahme der Contractionshöhe und der Frequenz beobachtete. Nach Ablauf 1 Stunde arbeitete der Darm kräftig weiter. Die Versuche sind in Tabelle III zusammengestellt.

Die hier kurz beschriebenen Versuche zeigen, daß zwischen der Wirkung der arsenigen Säure und der Arsensäure erhebliche quantitative Unterschiede bestehen. Am deutlichsten sind die Unterschiede bei den Versuchen am isolierten Froschherzen.

Am isolierten Darm sind die Unterschiede ebenfalls deutlich, allerdings nicht so stark ausgeprägt wie am isolierten Froschherzen. Es geht daraus hervor, daß Arsenite sowohl auf

Tabelle III.
Darmversuche.

Nummer des Versuchs	100 ccm Tyrodelösung enthielten Arsen mg	Resultat
		Arsenige Säure.
1	2,868	Abnahme der Contractionshöhe und der Frequenz.
2	13,54	Zuerst kräftigere Contractionen. Bald Abnahme der Contractionshöhe und der Frequenz.
3	30,58	Nach 3 Min. vollkommener Stillstand.
		Arsensäure.
4	2,5	Kaum eine Wirkung zu beobachten.
5	12,53	Erst nach 2 Std. geringe Abnahme der Contractionshöhe und der Frequenz.
6	25,06	Nach 20 Min. Abnahme der Contractionshöhe und der Frequenz. Auch nach 2 Std. kein Stillstand.

isolierte Organe wie auch auf den lebenden Organismus in gleichem Maße giftig sind. Die Arseniate dagegen wirken auf das isolierte Froschherz gar nicht giftig. Am isolierten Dünndarm ist eine Wirkung nachweisbar, und am stärksten ist sie ausgeprägt am lebenden Organismus des Warmblüters.

Wie hat man sich diese Tatsachen zu erklären?

Aus den Untersuchungen A. Heffters[1]) geht hervor, daß die Gewebe ein ziemlich starkes Reduktionsvermögen besitzen. Sie sind imstande, eine ganze Reihe von chemischen Substanzen zu reduzieren. Wie stark dieses Reduktionsvermögen ist, das geht daraus hervor, daß z. B. Kakodylsäure, die durch die leichten Reduktionsmittel wie schweflige Säure, Ferrosalze nicht reduzierbar ist, durch tierische Gewebe leicht zu Kakodyloxyd reduziert werden kann. „Wir lernen hieraus erkennen, daß die reduzierenden Substanzen des tierischen Organismus mit außerordentlich starken Affinitäten zum Sauerstoff begabt sind" [Heffter[2])].

Speziell haben Binz und Schulz[3]) den Nachweis geführt, daß Arsensäure auch extra corpus durch Gewebe zu arseniger

[1]) A. Heffter, Über die Wirkung des Schwefels auf Eiweißkörper. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **5**, 215, 1903.

[2]) A. Heffter, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **46**, 230, 1901.

[3]) C. Binz u. H. Schulz, Die Arsenwirkungen vom chemischen Standpunkt betrachtet. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **11**, 200, 1879.

Säure reduziert werden kann. Auch Cystein ist imstande, Arsensäure zu arseniger Säure zu reduzieren, wie A. Heffter[1]) gezeigt hat.

Es liegt somit sehr nahe, Reduktionsvermögen einerseits und Giftigkeit der Arsensäure andererseits in Parallele zu setzen. Je stärker das Reduktionsvermögen ist, um so giftiger ist auch die Arsensäure. Das isolierte Froschherz ist wohl kaum imstande, eine solche Reduktion herbeizuführen, deshalb ist auch die Arsensäure kaum giftig. Schon am isolierten Dünndarm muß man eine solche Reduktion annehmen, denn es zeigt sich, daß nach Ablauf einer gewissen Zeit die Arsensäure darauf giftig wirken kann. Diese Reduktion geht auch vor sich, obwohl Sauerstoff vorhanden ist. Der lebende Organismus ist erst recht imstande, die Arsensäure zu reduzieren. Deshalb sind auch die Unterschiede am lebenden Tier verhältnismäßig gering. Die Ansicht, die schon viele Forscher ausgesprochen haben, daß die Arsensäure erst dann giftig wird, wenn sie zu arseniger Säure reduziert werden kann, findet durch diese vergleichenden Untersuchungen eine Stütze.

Zusammenfassung.

Die Tatsache, daß die arsenige Säure weit giftiger ist als die Arsensäure, läßt sich durch intravenöse Injektionen der entsprechenden Natriumverbindungen bei Kaninchen zahlenmäßig feststellen. Die Giftigkeit der arsenigen Säure zu der Giftigkeit der Arsensäure verhält sich wie 6 zu 10.

Am isolierten Froschherzen ist die arsenige Säure zirka 300 mal giftiger wie die Arsensäure.

Der Kaninchendünndarm verhält sich ebenfalls ähnlich, wenn auch die Unterschiede nicht so stark ausgeprägt sind wie bei den Froschherzversuchen.

Es ist wahrscheinlich, daß die Giftigkeit der Arsensäure nicht ihr selbst zukommt, sondern auf der Reduktion zu arseniger Säure beruht.

---

[1]) A. Heffter, Medizinisch-naturwissenschaftliches Archiv **1**, Heft 1, 1907.

Über die Mengenverhältnisse der Hirnlipoide morphingewöhnter Hunde.

Von

Johannes Biberfeld.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 22. März 1915.)

Wenn man als Ziel der Pharmakologie, soweit sie medizinisch, nicht rein biologisch ist, die Erforschung der Wirkungen der als Heilmittel angewendeten oder anzuwendenden Substanzen im Tierexperiment ansieht, so stößt man unaufhörlich auf die Hemmung, daß wir mit wenigen Ausnahmen die fraglichen Wirkungen an gesunden Organismen und Organen erproben, während sie praktisch gegen deren Störungen verwendet werden sollen. Ganz besonders empfindlich macht sich diese Hemmung fühlbar, wenn es gilt, chronische Änderungen der normalen Funktion experimentell dem Verständnis näher zu bringen — sind doch fast alle derartigen Affektionen beim Tiere überhaupt nicht oder nur in durchaus anderer Weise als beim Menschen erzeugbar. Eine Ausnahme hiervon bietet, wenn man von den bakteriellen Infektionskrankheiten absieht, nur das Problem der Gewöhnung; hier gelingt es leicht, bei Tieren einen dem beim Menschen ähnlichen Zustand zu erzeugen: wie der Arsenikesser Dosen verträgt, die ausreichen, eine ganze Anzahl Ungewöhnter zu töten, kann man auch Hunde ebensoweit bringen. Noch vollkommener ist die bei Morphin durch einfache Steigerung der Dosen erzielte Gewöhnung; die behandelten Tiere vertragen selbst subcutan beigebrachte Dosen, die das Mehrfache der sonst tödlichen ausmachen. Und so ist denn auch die Gewöhnung an Morphin mehrfach experimentell bearbeitet worden; besonders durch die Feststellung von

Faust[1]), daß normale Tiere Morphin im wesentlichen unverändert ausscheiden, an Morphin gewöhnte aber das Alkaloid zu zerstören vermögen, schien die vorliegende Funktionsänderung mindestens teilweise geklärt zu sein. Doch hat bereits Cloetta[2]) Widerspruch gegen die Schlußfolgerungen Fausts erhoben. Einerseits fand er, daß auch nichtgewöhnte Tiere Morphin in recht großem Umfange zerstören können[3]), andererseits macht er darauf aufmerksam, daß mit der Faustschen Annahme für das Verständnis des eigentlichen Problems nicht viel gewonnen ist (l. c. S. 469 ff.)[4]). Denn bei dem schnellen Eintritt und Verlauf der Morphinwirkung ist die Toleranz der gewöhnten Individuen gegen die zum Teil ungeheuren auf einmal eingeführten Mengen des Giftes durch vermehrte Zerstörungsfähigkeit des Organismus kaum erklärbar. Noch weniger erklärt sind die, allerdings nur beim Menschen beobachtete, „Sucht" nach dem Alkaloide und die mit ihr zusammenhängenden sog. Abstinenzerscheinungen.

Einen erheblichen Gewinn für das Verständnis würde es, wie ich glaube, bedeuten, wenn es gelänge, Änderungen in der chemischen Zusammensetzung der bei chronischer Vergiftung besonders betroffenen Organe nachzuweisen. Es ist bisher überhaupt noch nicht gelungen, bei pathologischen Zuständen solche Änderungen, wenn man von den groben, z. B. bei der sog. Verfettung auftretenden absieht, in den Organen oder Körperflüssigkeiten zu finden; deswegen schien es mir der Mühe wert, gerade bei der Gewöhnung Versuche in dieser Richtung aufzustellen. Denn wie man sich auch im

[1]) E. St. Faust, Über die Ursache der Gewöhnung an Morphin. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **44**, 217.

[2]) M. Cloetta, Über das Verhalten des Morphins im Organismus und die Ursachen der Angewöhnung an dasselbe. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **50**, 453.

[3]) In neuester Zeit behauptet A. Valenti (Arch. di farmacol. sper. XVII, H. VI), daß die von Faust benutzte Tauber sche Methode der Morphinbestimmung in Organen zu quantitativen Untersuchungen unbrauchbar sei. — Gleichzeitig mit V. ist Dr. chem. K. Zahn, der ohne Kenntnis der italienischen Arbeit die Frage im hiesigen Institut nachprüfte, zu genau dem gleichen Resultate gelangt. Diese Zeitschr. **68**, 445, Anm.

[4]) Vgl. auch die Auseinandersetzungen von W. Rübsamen (aus dem Gottliebschen Institut). Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **59**, 227.

einzelnen die pharmako-dynamischen Wirkungen vorstellen mag, soviel ist doch gewiß, daß die einwirkende Substanz in irgendeiner Weise mit einem der Zellbestandteile chemisch in Beziehung treten muß. Wäre nun die Zusammensetzung der Zellen durch die chronische Vergiftung verändert, dann müßte auch die Reaktionsmöglichkeit mit dem Gifte eine andere geworden sein, und zwar nicht nur wenn ein wichtiger Bestandteil qualitativ alteriert, sondern auch schon wenn in den quantitativen Verhältnissen eine Verschiebung vor sich gegangen war. Letztere wieder könnte sowohl nach der positiven wie nach der negativen Seite vorliegen, — beidemal wäre das hervorstechendste Symptom, die Toleranz gegen die großen Dosen, ohne weiteres verständlich.

Für die experimentelle Bearbeitung der Morphiumgewöhnung kam in dieser Richtung natürlich nur ein Organ in Betracht, das Gehirn[1]). Hier habe ich, wie begreiflich, als erstes die „Lipoide" zur Untersuchung herangezogen, da sie ja nach der Ansicht der meisten Autoren, wenn auch vielleicht nicht so unmittelbar wie bei den Narkoticis der Fettreihe, doch auch bei den narkotisch wirkenden Basen an der Wirkung beteiligt sind oder diese beeinflussen können. Wenn es mir nun auch bisher nicht gelungen ist, sichere Unterschiede zwischen den Lipoiden normaler und morphingewöhnter Gehirne zu finden, so glaube ich doch, daß auch dieses Resultat der technisch sehr mühevollen Versuche mitteilenswert ist, zumal die Angaben über Gehirnlipoide in der Literatur spärlich sind.

Bei quantitativen Untersuchungen des Lipoidgehaltes eines daran so reichen Organs, wie es das Gehirn ist, ist die Art der vorbereitenden Trocknung vielleicht noch wichtiger als die Wahl der Extraktionsmethode. Ich habe als die wenigst eingreifende Methode die Trocknung des zum Brei zerriebenen, dünn auf Glasplatten ausgestrichenen Gehirns bei Zimmertemperatur im elektrisch betriebenen Ventilator gewählt; nach ca. 12 stündigem Luftüberleiten konnte die Trockensubstanz von den Platten abgekratzt werden. Sie wurde dann bis zum Versuche in einem evakuierten Exsiccator aufbewahrt, in dem sie übrigens nicht mehr nennenswert an Gewicht verlor.

[1]) Cloetta hat die Zersetzungskraft der Organe und besonders der Gehirne normaler und morphingewöhnter Tiere ohne sicheres Resultat untersucht (l. c.).

Benutzt habe ich, neben einigen normalen Hundegehirnen, die Gehirne von vier (durch subcutane Injektionen) an Morphin gewöhnten Hunden. Über die bei diesen erzielte Stufe der Gewöhnung gibt folgende Tabelle Auskunft.

	Anfangsgewicht	Endgewicht	Zeit	Anfangsdosis	Enddosis	Im ganzen g Morphin	Bemerkungen
1	6500	5000	7. IV. bis 2. V. 13	0,04	1,0	5,67	Stirbt am Tage nach der letzten Injektion: vorletzte = 0,8 g.
2	12000	11000	26. IV. bis 13. VII.	0,12	1,5	6,46	Getötet.
3	11000	7800	28. X. bis 13. I.	0,10	2,5	88,38	Stirbt unter Krämpfen, nachdem er die letzte Dosis (2,5) 3 mal vorher vertragen hatte.
4	5000	2800	21. VII. bis 4. XI.	0,06	0,6	29,40	Stark abgemagert.

Den Lipoidgehalt in den getrockneten Gehirnen der beiden ersten Tiere habe ich nach der Rosenfeldschen Alkohol-Chloroformmethode[1]) bestimmt. Diese ergab bei dem ersten einen Gehalt von 36 $^0/_0$ (der trockenen Substanz), bei dem zweiten einen solchen von 43 $^0/_0$; eine Bestimmung an einem gleich behandelten, normalen Hundegehirn ergab 40 $^0/_0$.

Gleichfalls eine, wenn man so sagen darf, Bruttobestimmung der Lipoide kann man erhalten, wenn man das getrocknete Gehirnpulver in dem Wiechowskischen Extraktionsapparat[2]) erschöpfend auszieht; man erhält dann alles bei Zimmertemperatur in Toluol Lösliche. Das Toluol wird abdestilliert und der Rückstand bei 100° zur Konstanz getrocknet. — Auch hier ergab sich kein wesentlicher Unterschied zwischen normalem und Morphin-Hirn; bei letzterem (Tier 4) schwankten die Werte zwischen 29,4 und 33,3 $^0/_0$, normales Gehirn (Pulver von zwei Hunden, gut gemischt) lieferte 33,1 $^0/_0$ Lipoide.

Eine bessere Fraktionierung der Fettkörper kann man mit Hilfe der von Kumagawa und Suto[3]) ausgearbeiteten Methode erzielen. Diese besteht im wesentlichen darin, daß Körperflüssigkeiten bzw. Organe durch Kochen mit starker Lauge auf-

[1]) Vgl. Abderhalden, Biochem. Arbeitsmethoden I, 238.

[2]) Vgl. Abderhalden, Biochem. Arbeitsmethoden III, 294.

[3]) Kumagawa u. Suto, Quantitative Bestimmung von Fett usw. Diese Zeitschr. 8, 338.

geschlossen, bei saurer Reaktion mit Äther extrahiert, durch Behandlung mit absolutem Äther und dann mit Petroläther gereinigt werden. In den so erhaltenen Gesamtlipoiden lassen sich noch die verseifbaren von den unverseifbaren (in meinem Falle anscheinend reines, gut krystallisierendes Cholesterin) Bestandteilen trennen. — Mit unwesentlichen Modifikationen (längerem Kochen, häufigerem Ausschütteln mit Äther[1]) u. ähnl.) gibt nach einiger Übung die Methode auch beim Gehirn untereinander übereinstimmende Analysenzahlen. — Bei den ersten Analysen mit dieser Methodik erhielt ich nun tatsächlich Zahlen, die zu beweisen schienen, daß das Morphingehirn (Hund 3 und 4) lipoidreicher als die parallel untersuchten normalen Gehirne wäre; die Unterschiede betrugen bis zu 10% (ca. 23% normal gegen ca. 33% bei Morphin). Doch stellte sich dieses Resultat bei Wiederholung der Versuche als falsch heraus; ich bekam schließlich auch bei den normalen Gehirnen Werte, die manchmal bis auf Bruchteile von Prozenten mit denen der Gewöhnten übereinstimmten. Von diesen Versuchen, die ich allein für maßgebend halte, will ich nur folgenden anführen:

Gehirnpulver vom Hunde 4; 1,878 g werden mit 25 ccm 20% Natronlauge 3 Stunden auf dem Wasserbade gekocht und nach Kumagawa und Suto weiterbehandelt; Gesamtlipoide darin = **0,6026** = **32%**, davon unverseifbar **0,2678** = **14,2%**.

Gehirnpulver von einem normalen Hunde; 2,0478 g genau wie oben behandelt, ergaben **0,667** Gesamtlipoide = **32,0%**, unverseifbar **0,2894** = **14,0%**.

Nach diesen Ergebnissen wird man sagen müssen, daß selbst ein Hundegehirn, das z. B. gegen 2,5 g Morphin — dem etwa 10fachen der tödlichen Dosis — resistent war, keine

[1]) Bei dem so sehr fettreichen Gehirn bildet die Ätherschicht der ersten Ausschüttelung meist eine dicke Emulsion, die sich aber durch reichlichen weiteren Zusatz von Äther und etwa 12stündiges Stehenlassen vollkommen lösen läßt. Es entstehen dann ebenso, wie z. B. im Blut, 3 Schichten: die Ätherschicht, eine dünne Schicht trüben Niederschlags und eine klare, wässerige, saure Schicht. — Einige Male habe ich zur Behebung der störenden Emulsion etwas Alkohol zugesetzt; eine Änderung der Analysenwerte wurde dadurch nicht bewirkt.

quantitative Änderung seiner Lipoide aufwies[1]). Das darf wohl einerseits als ein Hinweis aufgeführt werden, daß diese Bestandteile keine wesentliche Rolle bei der Alkaloidwirkung spielen, andererseits lehrt es wiederum, wie hartnäckig auch in durchaus pathologischen Zuständen das Gehirn seine chemische Zusammensetzung bewahrt. — Für die weitere Bearbeitung unseres Problems wird es die nächste Aufgabe sein, auf Änderungen der stickstoffhaltigen Bestandteile zu fahnden. In mehreren Vorversuchen habe ich in den nach Kumagawa und Suto entlipoideten Gehirnpulvern[2]) den Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt; quantitative Unterschiede fand ich auch hier nicht, z. B. gab ein Morphingehirn den Wert von 6,8%, ein normales 7,2%. Wenn nun auch diese Methode natürlich auf vollkommene Richtigkeit keinen Anspruch machen kann, so machen die Resultate es doch wahrscheinlich, daß auch beim Gesamt-N sich keine deutlichen Differenzen zwischen normalem und pathologischem Gehirn ergeben werden. Es wird vielmehr das Bestreben sein müssen, qualitative Änderungen aufzufinden, und zwar verspricht hier vor allem die Untersuchung des Organeiweißes (J. Pohl, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden V, 659) ein Ergebnis; denn dieses ist ja wohl der am unmittelbarsten mit der spezifischen Funktion verknüpfte Zellbestandteil.

---

[1]) Ich habe auch versucht, ob sich qualitative Änderungen der Lipoide nachweisen ließen, und zwar habe ich mich hier der Fraktionierung nach S. Fränkel (Abderhalden, Bioch. Arbeitsmethoden V, 613) bedient. Ich bin aber bisher bei normalen Gehirnen noch zu keinem brauchbaren quantitativen Resultate gekommen. — Diese Versuche sollen noch fortgesetzt werden.

[2]) d. h. in der trüben Zwischenschicht plus der wäßrigen sauren Schicht; diese wurden quantitativ aufgefangen, alkalisch gemacht, auf dem Wasserbade vom Äther befreit und zirka 1 Stunde gekocht. In einem aliquoten Teil der Lösung wurde dann N bestimmt.

Über den Einfluß des elektrischen Wechselstromes auf die Gärung der lebenden Hefe.

Von

Erik Hägglund.

(Eingegangen am 26. März 1915.)

Über die Wirkung des elektrischen Stromes auf die Arbeit der Fermente der alkoholischen Gärung haben neuerdings Palladin und Millak[1]) eine bemerkenswerte Abhandlung veröffentlicht. Es wurde dabei erwiesen, daß die Zymase, nicht aber die Carboxylase unter Einwirkung des elektrischen Wechselstromes in ihrer Wirksamkeit erheblich gesteigert wird. Während bei diesen Untersuchungen abgetötete Hefe — Hefanol und Lebedewsche Trockenhefe — benutzt wurde, war ich seit einiger Zeit damit beschäftigt, die Gärung der lebenden Hefe unter Einfluß des elektrischen Wechselstromes zu studieren. Aus sowohl theoretischen als praktischen Gesichtspunkten war es nämlich von großem Interesse, festzustellen, ob und in welchem Grade der elektrische Strom eine Beschleunigung der Gärung mit lebender Hefe hervorzurufen vermag.

Der Fortgang der alkoholischen Gärung läßt sich am einfachsten durch Messungen der entwickelten Kohlensäuremenge bestimmen. Diese Methode liefert auch im allgemeinen völlig zuverlässige und einwandfreie Resultate. In diesem Falle war es jedoch außerdem erwünscht, als Kontrolle bei einigen Versuchen den Zuckerverbrauch oder die gebildete Menge Alkohol zu bestimmen. Man konnte nämlich denken, daß die Zwischenprodukte der alkoholischen Gärung bei Einwirkung des elek-

---

[1]) Zeitschr. f. Gärungsphysiol. 4, 323, 1914.

trischen Stromes zum Teil unter Bildung von Kohlensäure zerfallen. Nach Palladin (a. a. O.) ist dies nicht der Fall. In einem Gärversuch mit brenztraubensaurem Kalium konnte eine Erhöhung der Kohlensäureausscheidung unter Einwirkung des Wechselstrom nicht bemerkt werden. Daraus wurde geschlossen, daß die Carboxylase dem Wechselstrom gegenüber indifferent ist. Gegen diese Behauptung wäre einzuwenden, daß außer Brenztraubensäure mehrere andere Zwischenprodukte auftreten könnten, deren Stabilität dem Wechselstrom gegenüber wir noch nicht kennen.

Versuchsmethodik.

Da die Gärungsgeschwindigkeit bekanntlich in hohem Grade von der Temperatur abhängig ist, so wurde bei den Versuchen die größte Sorgfalt darauf gelegt, daß die Gärungstemperatur in dem Versuch mit Strom und in dem Parallelversuche gleich war. In einigen Versuchen, wo die Stromstärke verhältnismäßig groß war, konnte eine erhebliche Temperatursteigerung bemerkt werden. Durch Schütteln der Gärungsgefäße im Thermostaten während der Gärung konnte diese Temperaturerhöhung beseitigt werden. Die Gärungstemperatur wurde mit zwei in Zehntelgraden gradierten Thermometern, die einander vollkommen gleich waren und deren Kugeln in die Gärflüssigkeit der Kolben hineinragten, kontrolliert. Während des Versuchs wurde kohlensäurefreie Luft durch die Kolben geleitet. Etwa mitgerissene Feuchtigkeit aus den Gärkolben wurde mit konzentrierter Schwefelsäure bzw. mit Chlorcalcium entfernt. Die Kohlensäure wurde in Kaliapparaten nach Bender und Hobein absorbiert und durch Wägung bestimmt.

Der Wechselstrom hatte eine Frequenz von 50 Perioden in der Sekunde, und die Polspannung betrug 50 Volt. Durch Einführung von Widerständen in den Stromkreis konnte die Spannung zwischen den Elektroden des Gärungsgefäßes geregelt werden.

Die Hefe war obergärige Hefe Rasse XII, die von dem Institut für Gärungsgewerbe in Berlin in vorzüglicher Reinheit geliefert wurde.

Versuche.

Versuch 1.

150 ccm 10⁰/₀ige Rohrzuckerlösung + 2 g Hefe.

Elektr. Spannung: 48 Volt. Stromstärke: 0,004 Amp. Temperatur: 18⁰.

Zeit	A Versuch mit Wechselstrom		B Parallelversuch ohne Strom		A/B
Stunden	CO_2 g	CO_2 pro Std. g	CO_2 g	CO_2 pro Std. g	
3,5	0,1725	0,0536	0,1310	0,0374	1,43
22,0	1,1745	0,0534	1,0590	0,0481	1,11
24,0	1,2520	0,0522	1,1811	0,0492	1,06
22,5	1,2100	0,0563	1,1209	0,0498	1,08

Die Wasserstoffionenkonzentration war am Ende des Versuches sowohl in A als in B $p_H = 3,2$. Die Bestimmung wurde mit der Sörensenschen Methode der Indicatoren ausgeführt.

Versuch 2.

150 ccm 10⁰/₀ige Rohrzuckerlösung + 2 g Hefe.

Elektr. Spannung: 48 Volt. Stromstärke: 0,005 Amp. Temperatur: 30⁰.

Zeit	A Versuch mit Wechselstrom		B Parallelversuch ohne Strom		A/B
Stunden	CO_2 g	CO_2 pro Std. g	CO_2 g	CO_2 pro Std. g	
2	0,1420	0,0710	0,0740	0,0370	1,92
2	0,3310	0,1655	0,2120	0,1060	1,56
2	0,2730	0,1365	0,2025	0,1018	1,35
4	0,5500	0,1375	0,5955	0,1489	0,92

Versuch 3.

150 ccm 10⁰/₀ige Rohrzuckerlösung + 2 g Hefe.

Elektr. Spannung: 48 Volt. Stromstärke: 0,005 Amp. Temperatur: 30⁰.

Zeit	A Versuch mit Wechselstrom		B Parallelversuch ohne Strom		A/B
Stunden	CO_2 g	CO_2 pro Std. g	CO_2 g	CO_2 pro Std. g	
2	0,1680	0,0840	0,0890	0,0445	1,89
2	0,2895	0,1447	0,2440	0,1220	1,19
2	0,3410	0,1705	0,2870	0,1435	1,19
4	0,6320	0,1630	0,5795	0,1449	1,09

Versuch 4.

150 ccm 10°/₀ige Rohrzuckerlösung + 0,25°/₀ K_2HPO_4 + 2 g Hefe.

Elektr. Spannung: 45 Volt. Stromstärke: 0,058 Amp. Temperatur: 30°.

Zeit	A Versuch mit Wechselstrom		B Parallelversuch ohne Strom		A/B
Stunden	CO_2 g	CO_2 pro Std. g	CO_2 g	CO_2 pro Std. g	
$2^1/_4$	0,3035	0,1349	0,1950	0,0867	1,56
$1^1/_4$	0,4220	0,3380	0,3150	0,2520	1,34
1	0,3290	0,3290	0,2400	0,2400	1,37
$1^1/_2$	0,3220	0,2146	0,3150	0,2100	1,02

Versuch 5.

150 ccm 10°/₀ige Rohrzuckerlösung + 0,25°/₀ K_2HPO_4 + 2 g Hefe.

Elektr. Spannung: 45 Volt. Stromstärke: 0,090 Amp. Temperatur: 30°.

Zeit	A Versuch mit Wechselstrom		B Parallelversuch ohne Strom		A/B
Stunden	CO_2 g	CO_2 pro Std. g	CO_2 g	CO_2 pro Std. g	
2	0,3255	0,1628	0,2370	0,1185	1,37
2	0,3820	0,1910	0,3205	0,1603	1,19
2	0,4428	0,2214	0,3885	0,1943	1,14
$1^1/_2$	0,3735	0,2490	0,3420	0,2280	1,09

Nach $7^1/_2$ Stunden Gärdauer wurden die H-Ionenkonzentrationen in den beiden Versuchen gemessen. p_H war in beiden gleich 4,6.

Aus diesen Tabellen geht deutlich hervor, daß der Wechselstrom eine Steigerung der Kohlensäureentwicklung hervorruft. Indessen war damit nicht völlig einwandfrei bewiesen, daß die enzymatische Tätigkeit der Hefe gesteigert worden war. Um völlige Klarheit in dieser Sache zu gewinnen, wurde in einigen Versuchen die Alkoholbildung, in anderen der Zuckerverbrauch gemessen, und zwar wurden diese Untersuchungen nach Beendigung der Versuche ausgeführt.

Die Menge Alkohol wurde durch Destillation der Gärflüssigkeit und spezifische Gewichtsbestimmung des Destillates mit

dem Pyknometer ermittelt. Aus dem spezifischen Gewicht konnte mit Anwendung der Windischschen Alkoholtafeln die Alkoholmenge bestimmt werden. Wenn es galt, die vergorene Zuckermenge zu bestimmen, wurde anstatt Rohrzucker Glucose benutzt. Die Zuckerbestimmungen wurden nach Bertrand[1]) ausgeführt.

Von diesen Versuchen seien hier die zwei folgenden erwähnt.

Versuch 6.

200 ccm 10%ige Rohrzuckerlösung + 2 g Hefe.

Elektr. Spannung: 45 Volt. Stromstärke: 0,005 Amp. Temperatur: 30°.

Zeit	Versuch mit Wechselstrom		Parallelversuch ohne Strom	
	Erzeugte Menge Alkohol	Entw. Kohlensäure	Erzeugte Menge Alkohol	Entw. Kohlensäure
Stunden	g	g	g	g
22	2,436	2,2659	2,187	2,0815

Versuch 7.

150 ccm 9,5%ige Traubenzuckerlösung + 2 g Hefe.

Elektr. Spannung: 15 Volt. Stromstärke: 0,03 Amp. Temperatur: 30°.

Ursprüngliche Zuckermenge: 14,230 g.

Zeit	Versuch mit Wechselstrom		Parallelversuch ohne Strom	
	Vergorene Zuckermenge	Kohlensäure	Vergorene Zuckermenge	Kohlensäure
Stunden	g	g	g	g
18	4,38	2,0896	4,16	1,9623

Es ergibt sich aus den Versuchen 6 und 7, daß nicht nur die Kohlensäureausscheidung, sondern auch die Alkoholbildung bzw. der Zuckerverbrauch unter dem Einfluß des elektrischen Stromes gesteigert wird.

Im Anschluß an die obigen Untersuchungen wurden einige Versuche betreffs des Verhaltens der Brenztraubensäure gegen den elektrischen Strom ausgeführt. Die Palladinschen Versuche hatten es wahrscheinlich gemacht, daß die

[1]) Bull. Soc. Chim. 35, 1285, 1906.

Gärung der Brenztraubensäure von dem elektrischen Wechselstrom nicht beeinflußt wird. Eine genaue Prüfung dieser Sache war jedoch aus mehreren Gesichtspunkten erwünscht, um so mehr, als aus einem orientierenden Versuch hervorgegangen war, daß eine Lösung von Brenztraubensäure unter Einwirkung von Wechselstrom, wenn auch nur wenig, zerlegt wird.

Bei den Versuchen wurde Brenztraubensäure von Merck benutzt.

Versuch 8.

150 ccm 0,8 %iges brenztraubensaures Kalium + 2 g Hefe. Elektr. Spannung: 10 Volt. Stromstärke: 0,02 Amp. Temperatur: 18°.

Zeit	Versuch mit Wechselstrom		Versuch ohne Strom		Differenz
	CO_2	CO_2 pro Std.	CO_2	CO_2 pro Std.	CO_2 pro Std.
Stunden	g	g	g	g	mg
20	0,0353	0,0018	0,0293	0,0015	0,3
25	0,0400	0,0016	0,0225	0,0009	0,7

Versuch 9.

150 ccm 0,8 %iges brenztraubensaures Kalium. Elektr. Spannung: 10 Volt. Stromstärke: 0,02 Amp. Temperatur: 18°.

Ohne Hefe.

Zeit Stunden	Kohlensäure mg	Kohlensäure pro Std. mg
16	5,5	0,45
7	5,0	0,71

Versuch 10.

150 ccm 0,1 %ige Brenztraubensäure. Elektr. Spannung: 10 Volt. Stromstärke: 0,005 Amp. Temperatur: 18°.

Ohne Hefe.

Zeit Stunden	Kohlensäure mg	Kohlensäure pro Std. mg	Bemerkungen
16	0,0	0,0	Ohne Strom
18	16,0	0,9	Mit Strom

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht hervor, daß die Gärung der Brenztraubensäure unter dem Einfluß des elektrischen Wechselstroms im Vergleich mit dem Versuch ohne Strom gesteigert wird. Diese Steigerung ist jedoch nicht größer als die Kohlensäurebildung, die Brenztraubensäure bzw. brenztraubensaures Kalium ohne Hefe unter Einwirkung des Wechselstromes zeigt. Wenn also die Palladinsche Behauptung, daß Brenztraubensäure durch den elektrischen Wechselstrom nicht zerlegt wird, durch die erwähnten Versuche nicht bestätigt werden konnte, so machen jedoch diese Untersuchungen es wahrscheinlich, daß der Wechselstrom keine merkliche Wirkung auf die Carboxylase hervorzurufen vermag.

Wir haben in den obigen Versuchen gefunden, daß der elektrische Wechselstrom tatsächlich eine Steigerung der enzymatischen Tätigkeit — der Zymasewirkung — der lebenden Hefe verursacht. Diese Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit ist anfänglich verhältnismäßig groß. Es wurden z. B. in einigen Versuchen Steigerungen von beinahe 100 $^0/_0$ beobachtet. Die relative Geschwindigkeit sinkt jedoch allmählich, so daß im allgemeinen die Geschwindigkeit in dem Versuch mit Strom und ohne Strom gleich groß ist, nachdem etwa 20 $^0/_0$ der ursprünglichen Zuckermenge vergoren ist. Man konnte vermuten, daß diese Abnahme der relativen Gärungsgeschwindigkeit auf eine Mehrproduktion von schädlichen Nebenprodukten der Gärung, in erster Linie Säuren, zurückgeführt werden konnte. Nun beruht im allgemeinen die hemmende Wirkung der Säuren auf ihren Gehalt an Wasserstoffionen. In den Versuchen 1 und 5 sind die Wasserstoffionenkonzentrationen nach Beendigung der Versuche bestimmt worden. Es erwies sich aus diesen Messungen, daß eine Mehrproduktion von H-Ionen in der Gärflüssigkeit bei den Versuchen mit Wechselstrom nicht eintritt. In den Versuchen mit Strom und ohne Strom waren die H-Ionenkonzentrationen immer gleichgroß. — Die Annahme liegt auch nahe, daß die gärungsbeschleunigende Wirkung des Wechselstromes in saurem Medium gehemmt wird. Die vorliegenden Versuche machen eine solche Hypothese plausibel. Um diese Sache klarzulegen, sind aber weitere Untersuchungen erforderlich.

Der Einfluß von Eiweiß und Eiweißabbauprodukten auf die Glykogenbildung in der überlebenden Schildkrötenleber, ein weiterer Beitrag zur Frage der Funktion der Leber bei Verarbeitung von Eiweiß und Eiweißabbauprodukten.

Von

Henry B. Richardson.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 27. März 1915.)

Den Anteil, den die Leber am Eiweißstoffwechsel und speziell am intermediären Stoffwechsel hat, klarzulegen ist von den verschiedensten Seiten her versucht worden. Fast möchte man sagen, unerwarteterweise sind die Schwierigkeiten, denen man hierbei begegnet, sehr groß. Unerwarteterweise, weil offenkundig die Leber einen sehr regen Anteil am Eiweißstoffwechsel nimmt. Neue Fragestellungen sind vornehmlich dadurch entstanden, daß unsere Anschauungen über den Abbau der Eiweißkörper im Magendarmkanal ganz andere geworden sind, als sie früher waren. Den neuen Erfahrungen entsprechend, war man genötigt, sich auch bestimmte Vorstellungen über das Verhalten der Leber gegenüber den mannigfachen Abbauprodukten des Eiweißes zu machen. Das wichtigste Problem, das hierbei in Frage steht, ist die Ermittelung des Anteiles, den die Leber an der weiteren Verarbeitung der Eiweißabbauprodukte nimmt. Dieses Problem steht im engsten Zusammenhange mit anderen Problemen von nicht geringer Bedeutung. So vornehmlich mit der Frage, ob in der Darmschleimhaut ein Wiederaufbau der gesamten Spaltungsprodukte des Eiweißes stattfindet, ferner mit der Frage, ob wirklich unter physiologischen Bedingungen das gesamte Eiweiß im Darmkanal bis zu den letzten Spal-

tungsprodukten abgebaut wird oder nicht. In Wahrheit lassen sich diese drei Probleme gar nicht voneinander trennen, und sowie man die Bearbeitung irgendeines derselben in Angriff genommen hat, muß man notwendigerweise die beiden anderen stets mit im Auge haben.

Die soeben betitelten Probleme und ihr Zusammenhang sind schon mehrfach der Gegenstand von Arbeiten gewesen, die Prof. Asher und seine Mitarbeiter angestellt haben. Ich nenne hier die Arbeit von Steck, der zeigte, daß die genauere Analyse des Zustandekommens des Eiweißminimums unter bestimmten Bedingungen die Möglichkeit der Annahme ausschließt, daß die Darmschleimhaut die ihr gebotenen Spaltprodukte insgesamt synthetisiere, daß also keinesfalls der Organismus auf dem Darmwege nur ein neutrales Bluteiweiß enthalte. Messerli zeigte, daß die höheren Spaltungsprodukte des Eiweißes, z. B. die Albumosen, genau so rasch resorbiert werden wie die tiefsten Spaltungsprodukte. Eine Tatsache, die in dem gleichen Sinne zeugte, wie die von Steck gemachte Feststellung. In direkterem Zusammenhange mit der Leberfunktion bei der Verarbeitung von Eiweißabbauprodukten stehen die Arbeiten von Böhm, Loeb, Pletnew und Tschannen. Böhm fand, daß das mikroskopische Aussehen der Leber ein verschiedenes ist, je nachdem Eiweiß oder Eiweißabbauprodukte verfüttert werden, Tatsachen, die neuerdings Berg mit anderen Methoden teilweise hat bestätigen können. Inwieweit man Veranlassung hat, mit seinen eigenen Auffassungen zu differieren, möge hier unerörtert bleiben. Loeb zeigte, daß Pepton und auch die Eiweißspaltungsprodukte — die letzteren allerdings in einem geringeren Umfange — die Lebertätigkeit erheblich anregen, was aus der Beeinflussung der Gallenabsonderung erschlossen wurde. Pletnew betrat einen neuen Weg, um den Anteil der Leber an der Eiweißverarbeitung kennen zu lernen, indem er den Kohlenhydratstoffwechsel der Leber bei verschiedener Eiweißernährung in Berücksichtigung zog. Er fand die bemerkenswerte Tatsache, daß die Zuckerassimilationsgrenze von Hunden wesentlich herabgesetzt wurde, wenn an Stelle von Eiweiß Eiweißabbauprodukte verfüttert wurden. Den bei weitem stärksten Einfluß hatte Witte-Pepton, bei dem noch die auffallende Erscheinung auftrat, daß im Harn Gallenfarbstoffe

erschienen. Der Schluß, den Pletnew aus seinen Beobachtungen zog, war der, daß die Zuckerassimilationsgrenze bei reichlicher Zufuhr von Eiweißabbauprodukten herabgesetzt wurde, weil die Leber bei der Verarbeitung derselben eine intensivere Arbeit zu leisten habe und dadurch entweder die Glykogenbildung oder die Glykogenaufstapelung leide. An diesem Punkte setzte die Arbeit von Tschannen ein. Derselbe war in der Lage, nachzuweisen, daß Pepton, an Ratten verfüttert, die Leber der Ratten glykogenfrei mache, und daß es bei Zugabe von Kohlenhydraten zur Nahrung den Glykogengehalt der Rattenleber auf einen niedrigen Wert herabdrücke. Daneben konstatierte er, daß wie bei Hunden im Harn Gallenfarbstoff auftrete. Casein erwies sich, wie schon früher gefunden wurde, als ein Glykogenbildner. In gespaltener Form jedoch ließ sich eine merkliche Hemmung der Glykogenbildung nachweisen. Der wichtige Schluß, der aus diesen Untersuchungen folgt, ist der, daß die ausschließliche Zufuhr von Eiweißabbauprodukten der Leber eine ganz andere Arbeit aufbürdet als die Ernährung mit nativem Eiweiß und mit gemischter Kost. Eine weitere Folge, die sich aus diesem Schlusse ergibt, ist die Wahrscheinlichkeit, daß der Organismus bei Ernährung mit den zureichenden Eiweißabbauprodukten zwar den gleichen Endeffekt erzielt wie bei Ernährung mit Eiweiß selbst, daß aber der Weg, auf dem dieser Endeffekt erreicht wird, nicht der gleiche ist. Diese Auffassung eröffnet neue Ausblicke, einmal auf die Frage der Leberfunktion bei Eiweißernährung, und zweitens auf das Verhalten der Leber unter natürlichen Bedingungen und beim experimentellen Diabetes.

Die Befunde von Tschannen, so wichtig sie sind, lassen immer noch einen Einwand zu, dessen Beseitigung nötig erscheint. Man könnte nämlich vermuten, daß die Beobachtungen, welche Pletnew und Tschannen gemacht haben, nicht auf einer eigentümlichen Leistung der Leber beruhten, sondern darauf, daß ein pathologischer Zustand im Darm entstanden sei und als Folge hiervon die Leber einfach in ihrer Funktion darniederliege. Um die Möglichkeit dieses Einwandes zu prüfen und ev. auszuschließen, sowie auch, um auf dem Boden der von Tschannen gefundenen Tatsachen weiterbauend die Beziehungen zwischen Eiweißabbauprodukten und Kohlenhydrat-

stoffwechsel in der Leber zu untersuchen, habe ich auf Anregung von Prof. Asher eine andere Methode herangezogen.

Die andere Methode bestand darin, daß die Leber der Schildkröte nach dem Verfahren von Grube mit einer Lösung perfundiert werden sollte, welche die zu prüfenden Substanzen enthielt, um ihren Einfluß auf die Glykogenbildung in der Leber festzustellen. Es ist klar, daß hierbei alle Schwierigkeiten, die aus der etwaigen Einwirkung der Eiweißabbauprodukte auf den Darm entstehen könnten, ausgeschaltet sind. Um so günstiger für die vorliegenden Zwecke erwies sich die Benutzung der Schildkrötenleber, als Grube ein Verfahren ausgearbeitet hat, um vergleichende Versuche an derselben Leber gleichzeitig nebeneinander anzustellen, indem er eine Methode ausarbeitete, um gleichzeitig die beiden Hälften der Leber, die funktionell voneinander vollständig getrennt wurden, gesondert zu durchströmen.

Grube beschreibt seine Methode folgendermaßen: Bei der auf dem Rücken liegenden Schildkröte wird die Verbindung zwischen Rücken- und Brustschild mit der Säge durchtrennt, nachdem alle Verbindungen mit der Haut vorn und hinten mit einem scharfen Messer und ebenso alle Muskeln an der inneren Fläche der Brustschilder gelöst worden sind. Um stärkere Blutungen zu vermeiden, muß das Messer dicht am Knochen entlang geführt werden. Nachdem das Brustschild entfernt worden ist, sieht man das bei vorsichtigem Arbeiten unversehrt gebliebene Peritoneum mit den beiden Venae umbilicales vor sich liegen. Man unterbindet die beiden letzteren an der Stelle, wo sie zur Leber aufsteigen. Da das Tier auf dem Rücken liegt, so senken sich die beiden Gefäße für den Beschauer nach unten. Hierauf werden die beiden Kanülen eingebunden; da der rechte in die Leber gehende Ast sehr kurz ist, ist es leichter, die Kanüle in den von oben kommenden Teil der Vene einzusetzen. Die Kanülen stehen durch einen Gummischlauch je mit einer Mariotteschen Flasche in Verbindung. Die Flaschen befinden sich in einem verstellbaren Stativ.

Für meine Zwecke habe ich die Methode dann in den folgenden Versuchen weiter ausgebildet. Es werden die vom Darm kommenden Venen abgebunden, was geschehen muß, um

zu verhindern, daß ein Teil der Durchströmungsflüssigkeit nach dem Darm zu abläuft. Die Leberbrücke wird mit einem vielfach verdoppelten, weichen wollenen Faden unterbunden. Dies geschieht in der Weise, daß man das Perikard vorsichtig von der Leber trennt und dann eine Präpariernadel durch das Omentum unter die Leberbrücke und hinauf zwischen Leber und Sinus venosus bringt. Dabei muß man darauf achten, daß keine von beiden Venae hepaticae abgebunden wird. Zuletzt wird der Herzbeutel eröffnet, so daß das Herz mit den beiden Vorkammern und den Gefäßen des Bulbus arteriosus frei daliegt. Nach Eröffnung des mittleren der drei sichtbaren Gefäße wird eine Glaskanüle in dasselbe eingeführt, und zwar so weit, daß die Spitze der Kanüle in dem Ventrikel selbst liegt.

Ein Auffangen der abfließenden Flüssigkeit war in meinen Versuchen nicht erforderlich. Die Geschwindigkeit der Durchleitung wurde so gewählt, daß das Herz ungefähr mit der normalen Pulszahl schlug. Daß die Leber in ihrer ganzen Ausdehnung durchströmt wurde, erkennt man, wie Grube schreibt, an ihrem gleichmäßigen Anschwellen beim ersten Eintreten der Flüssigkeit und an der eintretenden gleichmäßigen Färbung; an Stelle des dunklen, fast schwarzroten Farbentones tritt eine mehr schiefergraue Färbung ein mit deutlichem Hervortreten der acinösen Zeichnung.

Als Durchströmungsflüssigkeit wurde eine für jeden Versuch frisch bereitete Ringer-Lösung, die Zucker enthielt, benutzt. Beide Leberhälften erhielten die genau gleiche Salzzuckerlösung; jedoch wurde der Lösung, die eine der beiden Leberhälften durchströmte, entweder Eiweiß oder ein Eiweißabbauprodukt zugesetzt. Auf diese Weise konnte ermittelt werden, wie bei sonst ganz gleichen Bedingungen die zugesetzte Substanz auf den Glykogengehalt der Leber wirkte. Um die Bedingungen streng gleich zu machen, wurde auch dafür gesorgt, daß die Durchströmungsgeschwindigkeit in den beiden Leberhälften die gleiche blieb.

Sofort nach Abschluß des Versuches wurden die beiden Leberhälften auf Glykogen verarbeitet. Ich befolgte die Glykogengewinnung nach der Methode von Pflüger und bestimmte den Zucker nach der Methode von Bertrand, wobei ich mich an die Beschreibung hielt, die Tschannen gegeben hat, auf

dessen Arbeit ich hierfür nur zu verweisen brauche. Um ein Beispiel für die Genauigkeit der Bertrandschen Methode in meinen Händen zu haben, teile ich mit, daß eine Zuckerlösung, deren Prozentgehalt **0,280**% betrug, nach der Bertrandschen Methode **0,265**% ergab.

Ferner habe ich zur Prüfung der gesamten Methode einen Kontrollversuch mit Kaninchenleber angestellt, indem ich die gut gemischte Kaninchenleber in zwei Portionen teilte und in beiden Teilen den Glykogengehalt ermittelte. Ich fand in der einen Hälfte 7,2%, in der anderen Hälfte 6,8%.

Kontrollversuch mit Leberbrei.

Kaninchenleber, grob zerhackt und gut gemischt.

Erster Teil:	Titration 15,16 ccm.
	Gewicht der Leber 33,2 g.
	Glykogenmenge 2,37 g.
	Prozent Glykogen **7,2**%.
Zweiter Teil:	Titration 13 ccm.
	Gewicht der Leber 28,1 g.
	Glykogenmenge 1,920 g.
	Prozent Glykogen **6,8**%.

Eine Untersuchung des Glykogengehaltes der beiden Hälften der Schildkrötenleber, wenn dieselben mit genau der gleichen Ringer-Zuckerlösung durchströmt wurden, ergab innerhalb der hier ausgewerteten Fehlergrenze genau den gleichen Gehalt. Auf diesen wichtigen Punkt, dessen Erfüllung eine Voraussetzung für die Möglichkeit der Beantwortung der hier untersuchten Frage ist, komme ich noch zurück.

Im ersten Versuche wurde der Einfluß von Zusatz von Casein zur Durchströmungsflüssigkeit auf die Glykogenbildung untersucht. Das Casein wurde mit so viel verdünntem Kalkwasser versetzt, daß es sich gerade löste. Der über das Normale gehende Gehalt an Calcium in der Durchströmungsflüssigkeit hatte zur Folge, daß im Verlauf des Versuches das Herz zu schlagen aufhörte, was übrigens den Fortgang des Versuches nicht störte. Es ergab sich, daß diejenige Leberhälfte, die ohne Caseinzusatz durchströmt wurde, einen Glykogengehalt von 1,77% besaß, die andere, mit Casein durchströmte jedoch einen solchen von 1,72%. Der Unterschied der beiden Werte

liegt weit unter der Fehlergrenze, so daß geradezu von Gleichheit im Glykogengehalt der beiden Leberhälften gesprochen werden kann. In diesem Sinne dient der Versuch als eine Kontrolle für den experimentellen und chemischen Wert der Methode.

Versuch 1 (19. XI. 1914).

Casein.

Es wurden durchgeleitet:

Linker Lappen: Ringer-Lösung + 0,1 % Traubenzucker.

Rechter Lappen: Ringer-Lösung + 0,1 % Traubenzucker + Casein + Kalkwasser.

Menge der Flüssigkeit: 300 ccm auf jeder Seite.

Linker Lappen:	Titration (1) 2,6 ccm; (2) 2,6 ccm.
(ohne Casein)	Gewicht des Lappens 10,2 g.
	Glykogenmenge 0,181 g.
	Prozent des Glykogens **1,77 %**.
Rechter Lappen:	Titration (1) 2,5 ccm; (2) 2,6 ccm.
(mit Casein)	Gewicht des Lappens 10,5 g.
	Glykogenmenge 0,181 g.
	Prozent des Glykogens **1,72 %**.
Bemerkung:	Das Herz kam zum Stillstand.

Bekanntlich ist gefunden worden, daß Casein die Glykogenbildung in der Leber fördert. Zuletzt hat dies in einwandfreier Weise Tschannen an der Leber der Ratte gezeigt, die nach seiner Entdeckung durch Peptonfütterung vorher glykogenfrei gemacht worden war. In meinem Versuch ist von einer solchen Förderung durch zugesetztes Casein keine Rede, ein Befund an der Schildkrötenleber, den schon Grube ausdrücklich hervorhob.

Im nächsten Versuch wurde der die eine von beiden Leberhälften durchströmenden Flüssigkeit Pepton zugesetzt in einer Menge, daß der Peptongehalt etwa 2 % betrug.

Versuch 2.

Pepton.

Es wurden durchgeleitet:

Linker Lappen: Ringer-Lösung, enthaltend 0,1 % Zucker + Pepton fast 2 %.

Rechter Lappen: Dieselbe ohne Pepton.

Menge der Flüssigkeit: Links 440 ccm, rechts 405 ccm.

Linker Lappen: (mit Pepton)
Titration (1) 1,0 ccm; (2) 1,2 ccm.
Gewicht des Lappens 14,85 g.
Glykogenmenge 0,076 g.
Prozent Glykogen **0,51 %**.

Rechter Lappen: (ohne Pepton)
Titration (1) 2,8 ccm; (2) 3,2 ccm.
Gewicht des Lappens 13,10 g.
Glykogenmenge 0,086 g.
Prozent Glykogen **0,66 %**.

Bemerkungen: Das Herz schlug zuerst langsam, dann gar nicht. Die Flüssigkeit kam in der Bauchhöhle heraus. Wegen Luft in der Vena umbilicalis dextra mußte die Durchleitung unterbrochen werden, um die Kanüle aufs neue einzusetzen.

Das Ergebnis dieses aus verschiedenen Gründen technisch nicht gelungenen Versuches war, daß auf der mit Pepton durchströmten Leberseite der Prozentgehalt an Glykogen 0,51 betrug, während er auf der ohne Pepton durchströmten Seite 0,66 % betrug. Der Unterschied zwischen beiden Seiten ist größer als den Fehlergrenzen der Methode entspricht. Hierauf gestützt läßt sich aus diesem Versuch der Schluß ziehen, daß eine Andeutung von Hemmung durch Pepton vorliegt. Es darf bei diesem Versuche nur von einer Andeutung gesprochen werden, da die absoluten Werte des Glykogenbetrages recht niedrige sind, was, wie die Ergebnisse meiner spätern Versuche lehren, nur von zufälligen Ursachen bei den ersten Versuchen herrühren konnte. Im nachfolgenden 3. Versuch habe ich die schon vorhin erwähnte Kontrolle durchgeführt, indem die beiden Leberhälften mit genau der gleichen Lösung durchströmt wurden.

Versuch 3.
Ringer-Zuckerlösung, beiderseits.

Es wurden durchgeleitet: Ringer-Lösung, enthaltend 0,1 % Traubenzucker beiderseits.

Menge der Flüssigkeit: 350 ccm.

Dauer der Durchleitung: 1 Stunde.

Linker Lappen:
Titration (1) 10,2 ccm; (2) 10,2 ccm.
Gewicht des Lappens 8,00 g.

Glykogenmenge 0,304 g.
Prozent Glykogen **3,80 %**.

Rechter Lappen: Titration (1) 13,6 ccm; (2) 13,6 ccm.
Gewicht des Lappens 10,75 g.
Glykogenmenge 0,418 g.
Prozent Glykogen **3,89 %**.

Ergebnis: Die Fehlergrenze ist hier 2,4 % der kleineren Ziffer.

Es ergab sich, daß der Prozentgehalt an Glykogen im linken Lappen 3,80 %, im rechten Lappen 3,89 % betrug. Der Unterschied beider Werte ist so klein, daß man füglich von völliger Übereinstimmung sprechen darf, womit gleichzeitig die Gewähr gegeben ist, daß der Glykogengehalt verschiedener Teile derselben Leber der gleiche ist.

Im Besitz dieser Sicherheit konnte fortgefahren werden, den Einfluß von Pepton auf den Glykogengehalt der Leber zu prüfen.

Versuch 4.

Pepton.

Es wurden durchgeleitet:

Linker Lappen: Ringer-Lösung + 0,1 % Traubenzucker + 2 % Pepton (ohne kochen).

Rechter Lappen: Dieselbe Lösung ohne Pepton.

Menge der Flüssigkeit: 770 ccm beiderseits (auf jeder Seite).

Dauer der Durchleitung: 3 Stunden 20 Minuten.

Linker Lappen (mit Pepton): Titration (1) 2,3 ccm; (2) 2,5 ccm.
Gewicht des Lappens 8,00 g.
Glykogenmenge 0,0681 g.
Prozent Glykogen **0,85 %**.

Rechter Lappen (ohne Pepton): Titration (1) 4,6 ccm; (2) 4,7 ccm.
Gewicht des Lappens 7,65 g.
Glykogenmenge 0,133 g.
Prozent Glykogen **1,74 %**.

Bemerkungen:
11^{00} a. m. Anfang der Operation.
1^{25} p. m. Durchleitung in Ordnung.
2^{05} „ „ des Herzens.
3^{00} „ Keine Herzbewegungen mehr.
4^{40} „ Das Herz gibt minimale Contractionen nach mechanischem Reiz.

Ungefähr 100 ccm Flüssigkeit sind in die Bauchhöhle gekommen. Mit dem Anfang der Durchleitung vergrößerten sich die beiden Lappen. Die Lappen wurden graugrün, außer ein paar Stellen am Rande, die noch Blut enthielten.

Ergebnis: Pepton hemmt die Glykogenbildung.

In Versuch 4 wurde durch den linken Leberlappen eine 3 % ige Peptonlösung durchströmt. Das Pepton war vorher nicht gekocht, ein Punkt, der der Erwähnung wert ist, weil daran gedacht werden muß, daß bei einer gekochten und nichtgekochten Peptonlösung ein Unterschied bestehen könne. Der Glykogengehalt des rechten Leberlappens, der mit genau der gleichen Lösung ohne Pepton durchströmt worden war, enthielt am Ende der 3 Stunden 20 Minuten dauernden Durchströmung 1,74 % Glykogen, hingegen betrug der Glykogengehalt des linken mit Pepton durchströmten Leberlappens nur 0,85 %. Das Ergebnis zeigt mit größter Deutlichkeit, daß der Zusatz von Pepton eine sehr große Hemmung der Glykogenbildung verursacht. An und für sich vermochte die Leber unter den obwaltenden Bedingungen eine Glykogenmenge zu bilden, die durch den Prozentgehalt des rechten Leberlappens angezeigt wird. Diese Glykogenbildung aus Zucker wird durch das Pepton gehemmt. Es ist demnach der von Tschannen auf dem Fütterungswege gefundene, hemmende Einfluß des Peptons voll inhaltlich bestätigt worden und außerdem entschieden, daß diese Hemmung an der Leber selbst angreift und nicht etwa herrührt von krankhaften Erscheinungen im Darme infolge der Reizung der Darmschleimhaut durch Pepton.

Es ist bis jetzt immer die Rede davon gewesen, daß es sich um eine Hemmung der Bildung des Glykogengehalts handelt. Man muß aber die Frage aufwerfen, ob man hierzu berechtigt ist oder ob nicht vielmehr von einem Unvermögen der Leber, das etwa gebildete Glykogen aufzustapeln, gesprochen werden muß. Eine Kritik des vorliegenden Versuches führt jedoch eher zur Annahme, daß es sich wirklich um verminderte Bildung handeln müsse; denn wenn nach einer über 3 Stunden lang währenden Perfusion ein fast 2 % betragender Glykogengehalt in der Leber gefunden wird, muß eine Neubildung von Glykogen angenommen werden. Ich bin in meinen späteren Versuchen auf Glykogenwerte gestoßen, die gleichfalls keine andere Annahme zulassen.

Nachdem die hinsichtlich des Peptons aufgeworfene Frage entschieden worden war, sollte das gleichfalls von Tschannen geprüfte Erepton mit Hilfe meiner Methode untersucht werden. Hierzu diente der nachfolgende 5. Versuch.

Versuch 5.

Erepton.

Es wurden durchgeleitet:

Linker Lappen: Ringer-Lösung, enthaltend 0,1 % Traubenzucker. (Die Lösung wurde am Versuchstage gemacht.)

Rechter Lappen: Ringer-Lösung + 0,1 % Traubenzucker + 2 % Erepton.

Menge der Flüssigkeit: 800 ccm.

Dauer der Durchleitung: 1,5 Stunden.

Linker Lappen:	Titration (1) 7,9 ccm; (2) 8,2 ccm.
(kein Erepton)	Gewicht des Lappens 11 g.
	Glykogenmenge 0,597 g.
	Prozent Glykogen 5,43 %.
Rechter Lappen:	Titration (1) 8,6 ccm; (2) 8,7 ccm.
(Erepton)	Gewicht des Lappens 12,55 g.
	Glykogenmenge 0,658 g.
	Prozent Glykogen 5,24 %.

Bemerkungen: Die Flüssigkeit kam zum größten Teil in die Bauchhöhle hinaus, jedoch wurden beide Lappen vollständig durchgeleitet, wie aus der Vergrößerung der Lappen und der graugrünen Farbe hervorging. Das Herz fuhr fort zu schlagen, obwohl sehr langsam. Es war kein Loch zwischen Kanüle und Leber vorhanden.

Ergebnis: Erepton hat keinen Einfluß auf die Glykogenbildung.

Der Versuch wurde in der gleichen Weise ausgeführt wie der bisherige. Das Erepton entstammte einer Sendung, die die Firma Meister, Lucius & Brünings in liebenswürdiger Weise Prof. Asher zur Verfügung gestellt hat. Der Prozentgehalt des linken ohne Erepton durchströmten Leberlappens an Glykogen betrug 5,43 %. Der rechte Leberlappen, der mit 2 % Ereptonlösung durchströmt worden war, enthielt 5,24 % Glykogen. Wenn auch die beiden Zahlen nicht absolut übereinstimmen, so gestattet trotzdem der sehr geringe Unterschied auf beiden

Seiten, von einer Gleichheit des Glykogengehalts zu sprechen. Daraus folgt der Schluß, daß im Gegensatz zum Pepton, Erepton unter den vorliegenden Bedingungen keine Hemmung der Glykogenbildung aus Traubenzucker zu bewirken vermag. Das Resultat, zu dem ich gekommen bin, steht durchaus im Einklang mit demjenigen von Tschannen, der den gleichen Unterschied zwischen Pepton und Erepton mit seiner von der meinigen verschiedenen Methode fand. Ich bin auch geneigt, mich der Meinung von Tschannen anzuschließen, die er über die Ursache des verschiedenen Verhaltens von Erepton und Pepton geäußert hat. Es sind nämlich zwei Annahmen möglich: Entweder ist durch den tiefen Abbau des Eiweißes bis zum Erepton eine Reizwirkung, die den höheren Spaltungsprodukten des Eiweißes innewohnt, beseitigt worden, oder es halten sich im Erepton Stoffe mit förderndem und Stoffe mit hemmendem Einfluß die Wage.

Das Resultat des mit Erepton angestellten Versuches ist noch nach einer andern Richtung hin der Besprechung wert. Bekanntlich wird die Meinung vertreten, daß Aminosäuren zuckerbildend wirken, und diese Meinung stützt sich auf beweiskräftige Versuche. Alle beweiskräftigen Versuche sind nicht angestellt worden an normalen Tieren, sondern an Tieren mit experimentellem Diabetes. Bis Versuche gleich beweisender Art an normalen Tieren angestellt worden sind, bleibt vorläufig noch die Möglichkeit offen, daß es sich um eine besondere Erscheinungsweise pathologischen Geschehens in der Zelle handelt. Welches auch die richtige Ansicht sei, jedenfalls ist soviel sicher, daß in diesem vorliegenden Versuche keine Andeutung davon enthalten ist, daß die Summe der Aminosäuren, die im Erepton vorhanden sind, eine vermehrte Zuckerbildung aufzubringen vermögen. Man könnte daran denken, daß die Ursache dieses Versagens daran liege, daß die überlebende Schildkrötenleber zwar imstande sei, aus Zucker Glykogen zu bilden, nicht aber aus Aminosäuren. Diese Ansicht hat auf Grund seiner gleichfalls negativen Versuche schon Grube vertreten. Möglicherweise ist sie berechtigt, aber man kann einige Zweifel daran hegen, wenn man sich den chemischen Prozeß vergegenwärtigt, der stattfindet, wenn die Umbildung von Aminosäuren zu Zucker geschieht. Es muß eine Desamidierung und darauf eine Syn-

these aus Fettsäureresten stattfinden. Synthetische Fähigkeit wohnt der überlebenden Leber inne, und die Desamidierung ist ein einfacher, nicht an das Leben gebundener autolytischer Prozeß. Es ist also durchaus die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß die Nichtbildung von Glykogen unter der Einwirkung von Erepton nicht auf einer Unfähigkeit der lebenden Leber beruhe, sondern andern Ursachen seine Entstehung verdanke.

Im nächsten Versuche sollte die Wirkung eines Aminosäuregemisches geprüft werden. Es stand mir eine Mischung zur Verfügung, die aus Glykokoll, d-Leucin, d-Alanin, l-Valin bestand. Das Aminosäuregemisch entstammte der Sendung, die einst Prof. Abderhalden die Güte hatte, dem Institut von Prof. Asher anläßlich der Arbeit von A. Löb zur Verfügung zu stellen. Es ergab sich nach einer Durchleitung von 2 Stunden, daß der linke Leberlappen, der mit der aminosäurehaltigen Ringer-Zuckerlösung durchströmt worden war, 6,29 % Glykogen enthielt, während der rechte ohne Aminosäure durchströmte Leberlappen 6,50 % enthielt. Wenn auch wiederum zugunsten der letztgenannten Seite ein kleines Überwiegen zu konstatieren ist, so wird man füglich doch von einem gleichen Gehalt auf beiden Seiten sprechen müssen, und es ergibt sich daher, daß das Aminosäuregemisch keinen Einfluß auf die Glykogenbildung hatte.

Versuch 6 (13. XII. 14).

Aminosäuren: Ein Aminosäuregemisch aus Leim (Glykokoll, d-Leucin, d-Alanin, l-Valin).

Es wurden durchgeleitet:

Linker Lappen: Ringer-Lösung + 0,1 % Traubenzucker, + 2 % Aminosäuren.

Rechter Lappen: Ringer-Lösung + 0,1 % Traubenzucker.

Linker Lappen:	Titration (1) 10,7 ccm; (2) 11,0 ccm.
(Aminosäuren)	Gewicht des Lappens 10,35 g.
	Glykogenmenge 0,6234 g.
	Prozent des Glykogens **6,29 %**.
Rechter Lappen:	Titration (1) 11,5 ccm; (2) 11,7 ccm.
	Gewicht des Lappens 11,30 g.
	Glykogenmenge 0,7346 g.
	Prozent des Glykogens **6,50 %**.

Menge der Durchleitung: 500 ccm auf jeder Seite.

Dauer der Durchleitung: 2 Stunden.

Bemerkungen: Während der Abbindung der Leberbrücke wurde Lebersubstanz zerrissen, aber nachdem man die Stelle mit einer mit Gummi versehenen Klemme abgeklemmt hatte, hörte die Blutung auf.

Der linke Lappen wurde alsbald graugrün, während der rechte einige Zeit noch bluthaltig blieb.

11^{30} a. m. Anfang der Operation.

1^{15} a. n. 100 ccm Ringer-Lösung + 0,1 % Traubenzucker beiderseits, um das Präparat zu prüfen.

2^{00} p. m. Noch 50 ccm beiderseits.

3^{15} „ Anfang der experimentellen Durchleitung.

5^{15} „ Ende „ „ „

Ergebnis: Das betreffende Aminosäuregemisch hat keinen Einfluß auf die Glykogenbildung.

Demnach stellt sich heraus, daß die Gesamtheit der betreffenden Aminosäuren keine hemmende Wirkung besitzt, wie sie am Pepton zu beobachten war, andererseits aber fehlt jede Andeutung einer fördernden Wirkung, ein Fehlen, das um so bemerkenswerter ist, als in dem Gemisch Alanin gegenwärtig ist, dessen zuckerbildende Wirkung im experimentellen Diabetes feststeht, und von dem auch allerdings weniger beweiskräftige Beobachtungen mitgeteilt worden sind, die am normalen Tiere für Zuckerbildung zu sprechen scheinen.

Nachdem ich eine Anzahl von Erfahrungen mit der von mir benutzten Methode gewonnen hatte, kehrte ich nochmals zu einer Prüfung der Wirkung des Witteschen Peptons zurück. Um in diesem Versuche auszuschließen, daß etwa das von Spiro entdeckte Ferment im Pepton die Ursache seiner eigentümlichen Wirkung sei, wurde die angewandte Peptonlösung zuerst gründlich gekocht.

Versuch 7 (17. XII. 1914).
Pepton (Witte).

Es wurden durchgeleitet:

Linker Lappen: Ringer-Lösung + 0,1 % Traubenzucker + 2 % Pepton (gekocht).

Rechter Lappen: Ringer-Lösung + 0,1 % Traubenzucker.

Linker Lappen: Titration (1) 6,2 ccm; (2) 6,1 ccm.
Gewicht des Lappens 10,35 g.
Glykogenmenge 0,445 g.
Prozent Glykogen 4,30 $^0/_0$.

Rechter Lappen: Titration (1) 10,0 ccm; (2) 9,9 ccm.
Gewicht des Lappens 12,60 g.
Glykogenmenge 0,744 g.
Prozent Glykogen 5,90 $^0/_0$.

Menge der Flüssigkeit: 500 ccm auf jeder Seite.
Dauer der Durchleitung: 3 Stunden.
Herzfrequenz: 16 bis 11 pro Minute.

Bemerkungen: Der rechte Lappen wurde mit der Säge schwer beschädigt. Nachdem die Wunde möglichst mit Muskel geschlossen worden war, kam keine Flüssigkeit in die Bauchhöhle. Das Pepton ging durch den unversehrten Lappen.

Ergebnis: Pepton hemmt die Glykogenbildung.

Die Dauer der Durchleitung betrug 3 Stunden. Der Prozentgehalt an Glykogen auf der normalen rechten Leberseite betrug 5,9 $^0/_0$. Demgegenüber fand sich in dem mit Pepton durchströmten linken Lappen einen Glykogengehalt von nur 4,3 $^0/_0$. Der Unterschied ist ein in die Augen fallender, und wir haben hier in einem Versuche, wo die Glykogenbildung der benutzten Leber eine absolut gesicherte ist, mit aller Deutlichkeit die Anzeichen von der Hemmung der Glykogenbildung durch Witte-Pepton.

Nachdem so die Wirkung von Pepton sichergestellt worden ist, habe ich eine Prüfung mit hydrolysiertem Casein vorgenommen, um auch nach dieser Richtung hin die von Tschannen entdeckten Tatsachen auf einem neuen Wege zu untersuchen. Tschannen hatte bei seinen Fütterungsversuchen an Ratten gefunden, daß Casein selbst die Glykogenbildung in der Leber förderte, und hatte somit die Ergebnisse früherer Autoren an Hunden bestätigt. Andererseits stellte er fest, daß das vollständig hydrolysierte Casein eine ausgesprochene Hemmung verursachte.

Versuch 8 (1. I. 1915).
Hydrolysiertes Casein.

Es wurden durchgeleitet:

Linker Lappen: Ringer-Lösung (enthaltend 60 $^0/_0$ Über-

fluß von Natriumbicarbonat) + 0,1 % Traubenzucker + 1 % hydrolysiertes Casein.

Rechter Lappen: Genau ähnliche Ringer-Lösung + 0,1 % Traubenzucker.

Linker Lappen:	Titration 2,1 ccm Permanganat.
(hydrolys. Casein)	Gewicht des Lappens 8,75 g.
	Glykogenmenge 0,0397 g.
	Prozent Glykogen 0,46 %.
Rechter Lappen:	Titration 5,4 ccm Permanganat.
	Gewicht des Lappens 7,70 g.
	Glykogenmenge 0,1058 g.
	Prozent Glykogen 1,37 %.

Dauer der Präparation: 2 Stunden.

Dauer der Durchleitung: 3 Stunden.

Menge der Durchleitungsflüssigkeit: 800 ccm auf jeder Seite.

Herzfrequenz: 12.

Bemerkungen: Die Hohlvene wurde verletzt. Wenigstens die Hälfte der Flüssigkeit ist in die Bauchhöhle gekommen. Der rechte Winkel der Bauchhöhle wurde mit Flüssigkeit gefüllt; der linke blieb fast ganz leer. (Das Natriumbicarbonat wurde zugesetzt, um das Casein zu lösen, aber das gelang nicht vollständig.)

Ergebnis: Hydrolysiertes Casein hemmt die Glykogenbildung.

Zu diesem Versuche benützte ich hydrolysiertes Casein von der Firma Hoffmann, La Roche & Co. in Basel. Um dasselbe vollständig zu lösen, wurde der Ringer-Lösung etwas mehr Natriumbicarbonat zugesetzt wie sonst. Die Ringer-Lösung, welche die andere Leberseite durchströmen sollte, wurde auf den gleichen Natriumbicarbonatgehalt gebracht. Die Dauer der Durchleitung betrug 3 Stunden. Es fand sich im rechten Leberlappen 1,37 % Glykogen, während der mit Caseinlösung durchströmte Leberlappen nur 0,46 % Glykogen enthielt. Das Resultat dieses Versuchs ist nicht mißzuverstehen und bestätigt die von **Tschannen** gemachte Entdeckung. Hydrolysiertes Casein hemmt in ausgesprochenster Weise Glykogenbildung in der Leber. Es hebt also die Aufspaltung des Caseins die Fähigkeit zur Glykogenbildung, die der ungespaltene Körper besitzt, vollständig auf.

Ich habe außer dem hier ausführlich mitgeteilten Versuch noch einen weiteren angestellt, wo die linke Leberhälfte mit einer Lösung durchströmt wurde, die natives Casein enthielt, während die rechte Leberhälfte mit einer Lösung durchströmt wurde, die hydrolysiertes Casein enthielt. Leider ging bei der Niederschrift dieser Arbeit das ausführliche Protokoll verloren, so daß ich nur in der Lage bin, das mir vorliegende Endresultat mitzuteilen, dahinlautend, daß die Leberhälfte, die mit dem hydrolysierten Casein durchströmt worden war, 1,88 % Glykogen weniger enthielt als die andere Seite. Somit enthält auch dieser Versuch den sicheren Nachweis, daß im hydrolysierten Casein hemmende Einflüsse vorhanden sind.

Es war oben der Ansicht gedacht worden, daß in einem Gemisch von Aminosäuren möglicherweise hemmende und fördernde Stoffe nebeneinander vorkämen. Für diese Annahme gibt es Anhaltspunkte auf experimenteller Grundlage. Baer und Blum haben die schöne Entdeckung mitgeteilt, daß Glutaminsäure die Zuckerausscheidung im Diabetes herabsetzt. Auf dieser Grundlage fußend, habe ich geprüft, ob etwa der Zusatz von Glutaminsäure zu einer Ringer-Zuckerlösung die Glykogenbildung hemme. Zu diesem Zwecke wurde der Ringer-Zuckerlösung so viel einer reinen von Kahlbaum bezogenen Glutaminsäure zugesetzt, daß der Prozentgehalt 0,2 betrug. Es wurden je 800 ccm Flüssigkeit durch jede Leberhälfte geleitet.

Versuch 9 (14. I. 1915).
Glutaminsäure (Kahlbaum).

Es wurden durchgeleitet:

Linker Lappen: Ringer-Lösung + 0,1 % Traubenzucker.

Rechter Lappen: Dieselbe Ringer-Zuckerlösung + 0,2 % Glutaminsäure.

Menge der Flüssigkeit: 800 ccm auf jeder Seite.

Dauer der Durchleitung: 2 Stunden 15 Minuten.

Linker Lappen:	Titration (1) 6,7 ccm; (2) 6,9 ccm.
(ohne Glutaminsäure)	Gewicht des Lappens 7,70 g.
	Glykogenmenge 0,2155 g.
	Prozent Glykogen 2,80 %.
Rechter Lappen:	Titration (1) 6,2 ccm; (2) 6,3 ccm.
(mit Glutaminsäure)	Gewicht des Lappens 9,15 g.

Glykogenmenge 0,1970 g.
Prozent Glykogen 2,15 %.

2^{00} p. m. Anfang der Operation.
4^{15} „ Anfang der Durchleitung.
4^{40} „ Stillstand des Herzens.
Herzfrequenz: 10.

Bemerkungen: Wegen einer Verletzung der V. hepatica ist über die Hälfte der Flüssigkeit in die Bauchhöhle gekommen. Am Ende des Versuchs wurde gefunden, daß die Leberbrücke zu weit links abgebunden worden war, daher mußte die linke V. hepatica abgebunden worden sein. Trotzdem wurden die beiden Lappen vollständig durchgeleitet, wie man aus der anfänglichen Schwellung und der Änderung der Farbe sehen konnte.

Der rechte Lappen hatte nach der Durchleitung eine blasse, fast aschgraue Farbe, die sich sehr von der gewöhnlichen, dunkelgraugrünen Farbe unterschied.

Ergebnis: Glutaminsäure hemmt die Glykogenbildung.

Es ergab sich, daß der Glykogengehalt im linken Leberlappen, wo keine Glutaminsäure zugesetzt worden war, 2,8 % betrug, während auf der andern Leberseite, die mit Glutaminsäure durchströmt worden war, der Gehalt an Glykogen nur 2,5 % betrug. Der Unterschied ist viel größer, als die Fehlerquelle der Methode bedingt. Daher zeigt dieser Versuch, daß tatsächlich die Glutaminsäure einen hemmenden Einfluß auf die Glykogenbildung ausübt.

Auch hinsichtlich der Glutaminsäure ergibt sich mit Hilfe meiner Methode die gleiche Tatsache, die Tschannen an Ratten gefunden hatte, nämlich daß die Glutaminsäure die Glykogenbildung hemmt. Aus äußeren Gründen war ich nicht in der Lage, noch Versuche mit Alanin anzustellen. Dieselben sollen nachgeholt werden. Es kann wohl als wahrscheinlich angenommen werden, daß, ähnlich wie in der Arbeit von Tschannen, Alanin eine gewisse Förderung der Glykogenbildung verursacht. Somit ergibt sich aus meiner Versuchsreihe ein neuer Anhaltspunkt für die Annahme, daß in einem Gemisch von zahlreichen Aminosäuren, wie es beispielsweise Erepton ist, fördernde und hemmende Stoffe nebeneinander vorkommen.

Die Untersuchungen, die ich angestellt habe, geben Veran-

lassung, die mannigfachen Fragen, mit denen sich meine Experimente beschäftigt haben, durch neue Versuche weiter zu bearbeiten. Ich kann aber darauf hinweisen, daß durch meine Arbeit in erster Linie die Frage entschieden worden ist, in welcher Weise Pepton auf die Glykogenbildung in der Leber wirkt, nämlich in dem Sinne, daß sie dieselbe in starker Weise hemmt. Jetzt, wo alle möglichen Einwände gegen die Richtigkeit der Tatsache beseitigt worden sind, gewinnen alle Folgerungen, die in den früheren Arbeiten der Asherschen Schule aus dieser Tatsache gezogen worden, erhöhte Bedeutung. Das gleiche gilt von den ähnlichen Ansichten, die Nolf geäußert hat. Ich will kurz auf diese Folgerungen eingehen. Es wurde beobachtet, daß nach Darreichung von Pepton eine Änderung im Kohlenhydratstoffwechsel der Leber auftrat. Daraus wurde geschlossen, daß Pepton als solches in die Leber gelangt. Dieser Schluß ist durch meine Versuche jetzt als richtig bewiesen. Es wurde weiter geschlossen, daß die Leber an der Verarbeitung solcher Produkte, wie Pepton eines ist, beteiligt ist, eine Folgerung, die durch die Resultate meiner Arbeit an Wahrscheinlichkeit gewinnt.

Ein weiteres Resultat meiner Untersuchung, dessen Bedeutung in der gleichen Richtung liegt, ist der Nachweis, daß hydrolysiertes Casein im Gegensatz zu nativem Casein eine merkliche Hemmung der Glykogenbildung veranlaßt. Auch hier wiederum führt diese Tatsache erneut zu dem Schlusse, daß es für die Leber nicht gleichgültig sei, in welcher Form die stickstoffhaltigen Stoffe, die das Eiweiß aufbauen, ihr zugeführt werden. Es ist also trotz gleichen Endeffekts durchaus nicht das nämliche für den Organismus, ob ihm Eiweiß oder Eiweißabbauprodrukte zugeführt werden.

Was das Erepton betrifft, so erscheint mir als am meisten bemerkenswert, daß die Wirkung desselben keine besondere ist. Einerseits spricht diese Tatsache für die Güte dieses Präparats, die schon durch ganz anders geartete Versuche mehrfach erwiesen worden ist. Fragt man sich andererseits nach den Gründen, weshalb Erepton keine mindernde Wirkung auf die Glykogenbildung in der Leber besitzt, so erscheint vorläufig die Annahme, daß im Erepton fördernde und hemmende Komponenten vorhanden sind, nicht unwahrscheinlich. Dafür sprechen

vor allem die von Tschannen und mir gemachten Erfahrungen mit Glutaminsäure und Alanin. Besondern Nachdruck möchte ich darauf legen, daß Erepton, wie auch andere Aminosäuregemische, die ich benutzt habe, keinen fördernden Einfluß auf die Glykogenbildung erkennen lassen. Sollte sich die gleiche Tatsache an der Säugetierleber durch Versuche, die im hiesigen Laboratorium angestellt werden sollen, wiederfinden, so wäre dadurch der Nachweis geliefert, daß in der normalen Leber das Vermögen der Aminosäuren, die Zuckerbildung zu steigern, jedenfalls viel geringer sei, als im Zustande des experimentellen Diabetes.

Kurz zusammengefaßt, sind die Resultate meiner Arbeit die folgenden:

1. Durchströmung der Schildkrötenleber mit einer peptonhaltigen Ringer-Zuckerlösung hemmt in ausgesprochenster Weise die Glykogenbildung.

2. Hydrolysiertes Casein verursacht gleichfalls eine starke Hemmung der Glykogenbildung.

3. Erepton übt auf die Glykogenbildung keinen Einfluß aus. Möglicherweise handelt es sich um ein Ineinandergreifen hemmender und fördernder Einflüsse.

4. Ein Aminosäuregemisch aus Glykokoll, Leucin, d-Alanin und l-Valin bestehend, hat gleichfalls keinen Einfluß auf die Glykogenbildung. Diese sowie die vorhergehende Tatsache enthalten die Anregung, das etwaige verschiedene Verhalten von Aminosäuren im normalen und diabetischen Organismus zu prüfen.

5. Glutaminsäure hemmt die Glykogenbildung in der überlebenden Schildkrötenleber, womit der Nachweis geliefert worden ist, daß tatsächlich gewisse Aminosäuren einen hemmenden Einfluß besitzen können.

Neue Ergebnisse über das Verhalten des Blutzuckers nach Aderlässen.

Von

Ernst Hirsch.

(Aus dem Laboratorium des Handelsspitals in Prag. [Direktor: Prof. Dr. E. Münzer.])[1])

(Eingegangen am 31. März 1915.)

Nachdem Reinbach und ich[2]) beim Kaninchen das Bestehen einer echten Hyperglykämie und Glucosurie nach Fesselung und psychischer Erregung festgestellt hatten, hielten wir uns zu der Annahme berechtigt, daß gewisse experimentelle Hyperglykämieformen einer Nachprüfung bedürfen. Am nächstliegenden war es, die sogenannte Aderlaßhyperglykämie einer nochmaligen Untersuchung zu unterziehen mit Rücksicht darauf daß hier am ehesten infolge Blutentnahme aus der präparierten Carotis oder Jugularis am aufgespannten Tier die nach dem Aderlaß erhaltenen hyperglykämischen Werte irrtümlich auf den Aderlaß bezogen werden konnten, mit Vernachlässigung des Umstandes, daß Manipulationen, wie Aufspannen auf das Operationsbrett, Narkose, Freipräparierung der Halsgefäße, Abkühlung usw. allein schon genügen konnten, die gefundene Hyperglykämie zu erklären.

Bei der Wiederholung dieser Versuche mußte vor allem eine Änderung in der Versuchsanordnung Platz greifen derart, daß Fesselung, Narkose, überhaupt alle irgendwie zur Hyperglykämie führenden Eingriffe vermieden wurden. Nun hatte ich beobachtet, daß es beim Kaninchen leicht gelingt, kleinere und größere Aderlässe am nicht aufgebundenen, ruhig sitzenden

---

[1]) Ausgeführt mit Unterstützung des österreichischen Vereins für chemische und metall. Produktion, Aussig.

[2]) E. Hirsch und H. Reinbach, Zeitschr. f. physiol. Chem. **87**, H. 2, S. 122; **91**, H. 4, S. 292.

Tier an den Ohrvenen bzw. Ohrarterien vorzunehmen. Mit Leichtigkeit lassen sich hier bei gesunden, kräftigen, gut genährten Tieren in einer Sitzung verhältnismäßig schnell 100 ccm Blut und mehr entnehmen. Es muß jedoch ausdrücklich betont werden, daß die Kaninchen groß, die Ohrvenen gut ausgebildet sein müssen. Diese dilatieren sich dann beim Beklopfen oder Reiben stark, füllen sich strotzend mit Blut, ein kleiner Schnitt in die Längsrichtung und leichte Stauung mit dem Finger oder einer Klemme genügen, einen kräftigen Aderlaß herbeizuführen. Das stärkere Hervorspringen der Ohrvenen kann man sich noch durch Bestreichen mit Xylol oder Äther erleichtern, muß dabei jedoch berücksichtigen, daß durch nachfolgende Entzündung und Ödembildung die Ohren der Tiere leiden. Nicht selten wird bei dem Schnitt, besonders in die Randvene, auch die Arterie getroffen, das Blut spritzt dann direkt in feinem Strahl aus der Öffnung hervor.

Es sei noch besonders darauf hingewiesen, daß bei dieser ganzen Prozedur die Tiere sich auffallend ruhig verhalten, so daß von einer psychischen Erregung nicht die Rede sein kann. Auch nach größeren Blutentnahmen zeigen die Tiere kein abnormes Verhalten, sitzen ruhig im Käfig, nur das Bedürfnis nach Wasser ist, wie leicht verständlich, ein großes.

Zur Methodik sei ferner bemerkt, daß die Blutzuckerbestimmungen nach Bangs verbesserter Methode[1]) immer in Doppelanalysen vorgenommen wurden, wobei über die Brauchbarkeit dieser schönen Methode nichts mehr gesagt zu werden braucht, da sie allgemein üblich ist. Der Harn wurde qualitativ auf Zucker nach Trommer und Nylander geprüft, zur quantitativen Untersuchung bedienten wir uns, wenn nur kleine Harnmengen zur Verfügung standen, ebenfalls der Bangschen Mikromethode mit sehr gutem Erfolg. Größere Harnmengen wurden polarimetrisch untersucht. Der Harn wurde bei weiblichen Tieren abgedrückt, bei männlichen mittels Katheters entnommen.

Im folgenden seien die Versuche kurz angeführt und im Anschluß daran die entsprechenden Resultate besprochen. Die

---

[1]) I. Bang, Methode der Zuckerbestimmung. Berlin, Springer 1914.

Tiere, die bei Brot- und Kohlfütterung standen, hatten 20 bis 24 Stunden vor dem Versuch das letztemal Futter erhalten. Während des Versuchs hungerten sie und erhielten bloß Wasser in den Käfig gesetzt, wenn größere Blutmengen entnommen worden waren.

Einmaliger Aderlaß.

Versuch 1.

Männliches Kaninchen, Gew. 6000 g. 24 Stunden gehungert.

		Blutz. %	Harnz. %
3^{00}	Blutentnahme Ohrvene zur Zuckerbestimmung	0,10	0
3^{00} bis 3^{15}	Aderlaß von 30 ccm Blut aus der Ohrvene.		
3^{30}	Blutentnahme Ohrvene	0,14	
4^{00}	" "	0,12	
5^{15}	" "	0,12	
6^{30}	" "	0,12	0

Versuch 2.

Weibliches Kaninchen, Gew. 7500 g. 24 Stunden gehungert.

		Blutz. %	Harnz. %
2^{20}	Blutentnahme Ohrvene	0,10	0
2^{25} bis 2^{35}	Aderlaß Ohrvene 100 ccm Blut.		
2^{40}	Blutentnahme Ohrvene	0,14	
3^{15}	" "	0,16	
3^{45}	" "	0,15	
4^{30}	" "	0,13	
5^{00}	" "	0,13	0

Wir sehen aus beiden Versuchen, daß ein einmaliger Aderlaß, wenn relativ große Mengen Blut entnommen werden, eine zwar geringe, doch sicher nachweisbare Hyperglykämie zur Folge hat. Die Steigerung beträgt zwar relativ 40 bis 60%, ist aber absolut unbedeutend und jedenfalls eine viel geringere als die von anderen Autoren nach viel kleineren Aderlässen wie in Versuch 2 gefundene.

In den folgenden zwei Versuchen wurden je zwei kleinere Aderlässe, in dem dritten zwei größere Blutentnahmen vorgenommen.

Versuch 3.

Weibliches Kaninchen, Gew. 5000 g. 20 Stunden gehungert.
50 ccm Aderlaß.

	Blutz. %	Harnz %
2^{45} Blutentnahme Ohrvene	0,12	0
2^{45} bis 3^{00} I. Aderlaß Ohrvene 30 ccm Blut.		
3^{15} Blutentnahme Ohrvene	0,14	
3^{45} " "	0,12	
4^{15} " "	0,13	
4^{15} bis 4^{30} II. Aderlaß Ohrvene 20 ccm Blut.		
4^{45} Blutentnahme Ohrvene	0,15	
6^{00} " "	0,15	0

Versuch 4.

Weibliches Kaninchen, Gew. 4250 g. 20 Stunden gehungert.
60 ccm Aderlaß.

	Blutz. %	Harnz. %
11^{00} Blutentnahme Ohrvene	0,10	0
11^{00} bis 11^{30} I. Aderlaß Ohrvene 30 ccm Blut.		
11^{30} Blutentnahme Ohrvene	0,13	
12^{00} " "	0,14	
1^{00} " "	0,13	
2^{00} " "	0,12	
2^{00} bis 2^{30} II. Aderlaß Ohrvene 30 ccm Blut.		
2^{30} Blutentnahme Ohrvene	0,13	
3^{00} " "	0,11	
4^{00} " "	0,11	
5^{00} " "	0,10	
6^{00} " "	0,10	0

In den Versuchen 3 und 4 hatten zwei kleinere Aderlässe, durch die zusammen je 50 ccm resp. 60 ccm Blut entnommen worden waren, den gleichen Erfolg, wie der einmalige, etwas stärkere Aderlaß: Eine sehr geringe, aber doch nachweisbare Erhöhung der Blutzuckerkonzentration um ca. 30 bis 40%.

Dieselbe Versuchsanordnung, jedoch bei größerer Blutentnahme, ergab im folgenden Versuch eine erhebliche Hyperglykämie.

Versuch 5.

Weibliches Kaninchen, Gew. 6800 g. 24 Stunden gehungert.
90 ccm Aderlaß.

	Blutz. %	Harnz. %
4^{30} Blutentnahme Ohrvene	0,13	0
4^{30} bis 4^{45} I. Aderlaß Ohrvene 55 ccm (Tier ruhig).		
4^{50} Blutentnahme Ohrvene	0,14	
5^{30} " "	0,12	
6^{10} " "	0,12	
6^{10} bis 6^{15} II. Aderlaß 35 ccm aus der Randvene und Arterie.		
6^{40} Blutentnahme Ohrvene	0,25	
7^{20} " "	0,16	
8^{05} " "	0,13	
9^{30} " "	0,10	0

In den nun folgenden 5 Versuchen wurden die Tiere dreimal zur Ader gelassen. Es trat jedesmal eine bedeutende Blutzuckererhöhung ein, so daß sich ein bestimmtes Verhältnis zwischen Größe der entnommenen Blutmenge und Erhöhung des Blutzuckerspiegels ergab. Dieses Verhältnis tritt im Verlauf des Versuches deutlich in Erscheinung.

Die Gesamtmenge des durch Aderlaß gewonnenen Blutes schwankte zwischen 97 ccm und 120 ccm, Blutmengen, die weitaus größer sind als die von anderen Autoren bei ihren Versuchen entnommenen.

Mit der Höhe des Blutverlustes geht die Blutzuckerzunahme parallel. In einem Versuch, in dem die Blutzuckerkonzentration 0,27% erreichte, trat Zucker im Harn auf; diese Erscheinung ist jedoch nicht konstant; wir wollen später noch darauf zurückkommen.

Dreimaliger Aderlaß.

Versuch 6.

Weibliches Kaninchen, Gew. 5000 g. 20 Stunden gehungert.
97 ccm Aderlaß.

	Blutz. %	Harnz. %
11^{00} Blutentnahme Ohrvene	0,13	0
11^{00} bis 11^{20} I. Aderlaß 32 ccm Ohrvene.		

11^{30} Blutentnahme Ohrvene	. . . .	0,13
12^{00} " "	. . . .	0,14
12^{30} " "	. . . .	0,14
12^{30} bis 12^{50} II. Aderlaß 30 ccm Ohrvene.		
12^{52} Blutentnahme Ohrvene	. . . .	0,18
1^{30} " "	. . . .	0,17
2^{30} " "	. . . .	0,16
2^{40} bis 3^{00} III. Aderlaß 35 ccm Ohrvene. Tier etwas unruhig.		
3^{05} Blutentnahme Ohrvene	. . . .	0,26
3^{30} " "	. . . .	0,26
4^{00} " "	. . . .	0,26
4^{35} " "	. . . .	0,26
5^{30} " "	. . . .	0,27 {16 ccm 1,24 %
6^{40} " "	. . . .	0,23
7^{40} " "	. . . .	0,16
9^{00} " "	. . . .	0,15

Versuch 7.

Männliches Kaninchen, Gew. 7000 g. 20 Stunden gehungert.
100 ccm Aderlaß.

	Blutz. %	Harnz. %
10^{45} Blutentnahme Ohrvene zur Untersuchung . .	0,13	0
10^{50} bis 10^{55} I. Aderlaß 35 ccm Ohrvene.		
10^{55} Blutentnahme Ohrvene	0,12	
11^{25} " "	0,14	
11^{55} " "	0,15	
12^{00} bis 12^{05} II. Aderlaß 30 ccm Ohrvene.		
12^{10} Blutentnahme Ohrvene	0,14	
12^{35} " "	0,24	
1^{30} " "	0,22	
2^{00} " "	0,16	
2^{05} bis 2^{13} III. Aderlaß 35 ccm Ohrvene.		
2^{15} Blutentnahme Ohrvene	0,16	
2^{45} " "	0,27	
3^{45} " "	0,28	
4^{45} " "	0,25	
5^{45} " "	0,23	0
7^{00} " "	0,16	

Versuch 8.

Männliches Kaninchen, Gew. 3700 g. 20 Stunden gehungert.

95 ccm Aderlaß.

Zeit		Blutz. %	Harnz. %
10^{45}	Blutentnahme Ohrvene zur Untersuchung	0,14	0
11^{00} bis 11^{10}	I. Aderlaß 30 ccm Ohrvene. Tier ruhig.		
11^{10}	Blutentnahme Ohrvene	0,15	
11^{30}	„ „	0,17	
12^{30}	„ „	0,15	
1^{30}	„ „	0,14	
1^{45} bis 1^{55}	II. Aderlaß 30 ccm Ohrvene.		
1^{55}	Blutentnahme Ohrvene	0,15	
2^{25}	„ „	0,16	
3^{25}	„ „	0,13	
4^{00}	„ „	0,11	
4^{10} bis 4^{30}	III. Aderlaß 35 ccm Ohrvene. Tier ruhig.		
4^{35}	Blutentnahme Ohrvene	0,24	0
5^{00}	„ „	0,24	
6^{00}	„ „	0,19	
7^{00}	„ „	0,15	
8^{00}	„ „	0,14	

Versuch 9.

Männliches Kaninchen, Gew. 6000 g. 20 Stunden gehungert.

120 ccm Aderlaß.

Zeit		Blutz. %	Harnz. %
11^{00}	Blutentnahme Ohrvene zur Untersuchung	0,11	0
11^{15} bis 11^{25}	I. Aderlaß 50 ccm Ohrvene.		
11^{25}	Blutentnahme Ohrvene	0,15	
12^{05}	„ „	0,16	
1^{00}	„ „	0,13	
2^{00}	„ „	0,11	
2^{15} bis 2^{30}	II. Aderlaß 40 ccm Ohrvene. Tier ruhig.		
2^{30}	Blutentnahme Ohrvene	0,16	
3^{00}	„ „	0,16	
4^{00}	„ „	0,11	
4^{45} bis 5^{00}	III. Aderlaß 30 ccm Ohrvene.		

		Blutz. %	Harnz. %
5^{30}	Blutentnahme Ohrvene	0,24	
6^{00}	" "	0,16	0
6^{30}	" "	0,15	
8^{00}	" "	0,13	

Versuch 10.

Männliches Kaninchen, Gew. 3000 g. 24 Stunden gehungert 110 ccm Aderlaß.

		Blutz. %	Harnz. %
10^{45}	Blutentnahme Ohrvene zur Untersuchung	0,11	0
10^{45} bis 11^{10}	I. Aderlaß 42 ccm Ohrrandvene und Arterie.		
11^{10}	Blutentnahme Ohrvene	0,13	
11^{40}	" "	0,12	
12^{40}	" "	0,12	
1^{30}	" "	0,12	
2^{15} bis 2^{40}	II. Aderlaß 40 ccm Ohrvene und Arterie.		
2^{40}	Blutentnahme Ohrvene	0,16	0
3^{00}	" "	0,19	
4^{00}	" "	0,15	
5^{00}	" "	0,14	
6^{15} bis 6^{45}	III. Aderlaß 28 ccm Ohrvene.		
6^{45}	Blutentnahme Ohrvene	0,20	
7^{15}	" "	0,26	
8^{15}	" "	0,25	
9^{15}	" "	0,18	
10^{15}	" "	0,19	0

In Versuch 11 erfolgte ein viermaliger Aderlaß, die entzogene Blutmenge betrug im ganzen 130 ccm. Der Blutzuckergehalt stieg dementsprechend auf ein höheres Niveau als in den vorhergehenden Versuchen. Im Harn war, wie in Versuch 6, Zucker nachzuweisen.

Viermaliger großer Aderlaß.

Versuch 11.

Männliches Kaninchen, Gew. 4000 g. 20 Stunden gehungert. 130 ccm Aderlaß.

		Blutz. %	Harnz. %
10^{45}	Blutentnahme Ohrvene zwecks Untersuchung	0,12	0
10^{55} bis 11^{02}	I. Aderlaß 30 ccm Ohrvene und Ohrarterie.		

Zeit		Blutz.	Harnz.
11^{05}	Blutentnahme Ohrvene	0,15	
11^{45}	" "	0,15	
12^{40}	" "	**0,16**	
1^{30}	" "	0,15	
1^{30} bis 1^{40}	II. Aderlaß 30 ccm Ohrvene.		
2^{00}	Blutentnahme Ohrvene	**0,17**	
3^{45}	" "	0,14	
4^{00}	" "	0,13	
4^{05} bis 4^{15}	III. Aderlaß 35 ccm Ohrvene.		
4^{20}	Blutentnahme Ohrvene	0,18	
4^{45}	" "	**0,21**	
5^{30}	" "	0,15	
6^{30}	" "	0,14	
7^{00} bis 7^{15}	IV. Aderlaß 35 ccm Ohrvene.		
7^{20}	Blutentnahme Ohrvene	**0,31**	
7^{50}	" "	0,28	1,5
8^{30}	" "	0,25	
9^{00}	" "	0,16	

Daß nicht die Zahl der Aderlässe für die Steigerung des Blutzuckergehaltes maßgebend ist, geht aus folgenden zwei Versuchen hervor. In dem einen wurden durch 5 kleine Aderlässe 76 ccm Blut, in dem anderen durch 7 kleine Aderlässe 118 ccm Blut entnommen. Der Blutzuckergehalt überstieg nicht die Grenze von 0,15 $^0/_0$. Wir sehen also, daß wenn selbst große Blutmengen, jedoch in kleinen Einzelportionen, entzogen werden, eine nur geringe, unwesentliche Blutzuckersteigerung eintritt. **Maßgebend ist also die Menge des auf einmal abgelassenen Blutes.**

5 kleine Aderlässe.

Versuch 12.

Weibliches Kaninchen, Gew. 3500 g. 20 Stunden gehungert.
76 ccm Aderlaß.

Zeit		Blutz. %	Harnz. %
11^{15}	Blutentnahme Ohrvene zwecks Untersuchung	0,09	0
11^{15} bis 11^{18}	I. Aderlaß 15 ccm Ohrvene.		
11^{45}	Blutentnahme Ohrvene	0,09	
12^{35}	" "	0,10	

		Blutz. %	Harnz. %
12^{40} bis 12^{45}	II. Aderlaß 21 ccm Ohrvene.		
12^{50}	Blutentnahme Ohrvene	0,10	
1^{20}	" "	0,10	
2^{25}	" "	0,10	
2^{28} bis 2^{30}	III. Aderlaß 15 ccm Ohrvene.		
2^{45}	Blutentnahme Ohrvene	0,10	
3^{30}	" "	0,10	
4^{00} bis 4^{05}	IV. Aderlaß 10 ccm Ohrvene.		
4^{30}	Blutentnahme Ohrvene	0,10	
5^{30}	" "	0,10	
5^{30} bis 5^{40}	V. Aderlaß 15 ccm Ohrvene.		
6^{00}	Blutentnahme Ohrvene	0,09	0
6^{30}	" "	0,10	
7^{15}	" "	0,10	

7 kleine Aderlässe.

Versuch 13.

Weibliches Kaninchen, Gew. 5000 g. 20 Stunden gehungert.

118 ccm Aderlaß.

		Blutz. %	Harnz. %
11^{15}	Blutentnahme Ohrvene zwecks Untersuchung .	0,12	0
11^{20} bis 11^{30}	I. Aderlaß 15 ccm Ohrvene.		
11^{30}	Blutentnahme Ohrvene	0,12	
12^{00}	" "	0,13	
12^{45}	" "	0,12	
12^{50} bis 12^{52}	II. Aderlaß 17 ccm Ohrvene.		
1^{00}	Blutentnahme Ohrvene	0,13	
1^{30}	" "	0,12	
2^{20} bis 2^{30}	III. Aderlaß 16 ccm Ohrvene.		
2^{30}	Blutentnahme Ohrvene	0,13	
3^{00}	" "	0,13	
4^{00}	" "	0,12	
4^{00} bis 4^{02}	IV. Aderlaß 20 ccm Ohrvene.		
4^{30}	Blutentnahme Ohrvene	0,15	
5^{25} bis 5^{30}	V. Aderlaß 16 ccm Ohrvene.		
6^{00}	Blutentnahme Ohrvene	0,12	
6^{15}	" "	0,11	
7^{00}	" "	0,13	
7^{00} bis 7^{02}	VI. Aderlaß 16 ccm Ohrvene.		

		Blutz. %	Harnz. %
7^{30}	Blutentnahme Ohrvene	0,13	
8^{30}	„ „	0,13	
8^{31} bis 8^{35}	VII. Aderlaß 18 ccm Ohrvene.		
9^{00}	Blutentnahme Ohrvene	0,13	0
10^{00}	„ „	0,12	

Daß die durch Aderlässe entnommene Gesamtblutmenge für die Blutzuckersteigerung ausschlaggebend ist, geht aus den beiden folgenden Versuchen hervor. Wir sehen hier nämlich, daß Tiere, die durch frühere Blutverluste schon anämisch sind, bereits auf den ersten größeren Aderlaß (50 bzw. 60 ccm) mit einer starken Blutzuckersteigerung auf über 0,20 % reagieren, was wir in den früheren Versuchen nach einem Aderlaß nicht beobachteten. Jeder folgende Aderlaß hat wieder einen dementsprechenden Blutzuckeranstieg zur Folge.

Versuch 14.

Männliches Kaninchen, Gew. 3700 g. Schon früher in Versuch 8 verwendet. Im Blut: 2,4 Mill. rote Blutkörperchen, 4300 weiße Blutkörperchen, 60 % Hämoglobin.

95 ccm Aderlaß.

		Blutz. %	Harnz. %
11^{00}	Blutentnahme Ohrvene zwecks Untersuchung	0,13	
11^{26} bis 11^{45}	I. Aderlaß 60 ccm Ohrvene und Arterie.		
12^{00}	Blutentnahme Ohrvene	0,31	Kath. Blase leer
12^{30}	„ „	0,36	
1^{00}	„ „	0,30	
2^{00}	„ „	0,21	
3^{00}	„ „	0,23	
4^{00}	„ „	0,17	
4^{05} bis 4^{30}	II. Aderlaß 35 ccm Ohrvene.		
4^{30}	Blutentnahme Ohrvene	0,16	
5^{00}	„ „	0,23	0,45
6^{00}	„ „	0,16	
7^{00}	„ „	0,13	

Versuch 15.

Männliches Kaninchen, Gew. 6000 g. Schon früher in Versuch 9 gebraucht (anämisch).

113 ccm Aderlaß.

		Blutz. %	Harnz. %
10^{45}	Blutentnahme Ohrvene zwecks Untersuchung	0,11	0
10^{45} bis 11^{00}	I. Aderlaß 50 ccm Ohrvene.		

11^{00} Blutentnahme Ohrvene	. . . .	0,15	
11^{30} " "	. . . .	0,22	
12^{30} " "	. . . .	0,15	
1^{40} " "	. . . .	0,16	
1^{45} bis 2^{00} II. Aderlaß 50 ccm Ohrvene.			
2^{00} Blutentnahme Ohrvene	. . . .	0,22	
2^{45} " "	. . . .	0,21	0
3^{30} " "	. . . .	0,20	
4^{30} " "	. . . .	0,15	
5^{45} bis 6^{00} III. Aderlaß, mit Absicht nur 13 ccm.			
6^{00} Blutentnahme Ohrvene	. . . .	0,14	
6^{30} " "	. . . .	0,13	
7^{30} " "	. . . .	0,12	
8^{30} " "	. . . .	0,13	0

Im Versuch 16 handelte es sich um ein Tier, das 90 Minuten vor dem Versuch reichlich mit Kohlehydraten gefüttert worden war (400 g Schwarzbrot). Infolgedessen hatte das Tier schon zu Beginn des Versuches einen hohen, übernormalen Blutzuckergehalt, der gleich nach dem I. Aderlaß von 75 ccm zu einem höheren Grade von Hyperglykämie führte. Der II. Aderlaß führte zu einer abermaligen, jedoch schon geringeren Blutzuckersteigerung, im übrigen unterschieden sich jedoch die Verhältnisse in nichts von denen bei Tieren mit normalen Blutzuckeranfangswerten. Die Blutzuckersteigerung auf 0,36 % nach dem I. Aderlaß hatte Glucosurie zur Folge, der Zuckergehalt des Harnes steigt nach dem II. Aderlaß noch an. Die Glucosurie ist zum Teil auf die hohe alimentäre Hyperglykämie zu beziehen, von der wir wissen, daß sie beim Kaninchen leicht zustande kommt.

Versuch 16.

Weibliches Kaninchen, Gew. 5950 g. 90 Min. vor dem Versuch 400 g Schwarzbrot gefressen.

125 ccm Aderlaß.

	Blutz. %	Harnz. %
11^{00} Blutentnahme Ohrvene zwecks Untersuchung	0,25	
11^{15} bis 11^{45} I. Aderlaß 75 ccm Ohrvene.		

11^{45}	Blutentnahme Ohrvene	. . . .	0,32	
12^{15}	" "	. . . .	**0,36**	
12^{50}	" "	. . . .	0,31	
1^{35}	" "	. . . .	0,29	
2^{30}	" "	. . . .	0,26	1
3^{00}	" "	. . . .	0,26	
3^{15} bis 3^{22}	II. Aderlaß 50 ccm Ohrvene.			
3^{30}	Blutentnahme Ohrvene	. . . .	0,29	
4^{00}	" "	. . . .	0,30	
5^{00}	" "	. . . .	**0,31**	
6^{00}	" "	. . . .	0,31	
7^{00}	" "	. . . .	0,25	15 ccm 1,64
9^{00}	" "	. . . .	0,17	

In den beiden folgenden Versuchen sollte an Tieren, die mehrere Tage gehungert hatten, der Einfluß des Aderlasses auf den Blutzuckergehalt geprüft werden. Die Tiere waren in einem besonderen reinen Käfig eingesperrt und bekamen nur jeden Tag die nötige Menge Wasser vorgesetzt. Bei dem ersten dieser Versuche handelte es sich um ein Tier, das 5 Tage gehungert hatte und dem durch einen 4 maligen Aderlaß 129 ccm Blut aus dem Ohr entnommen wurden, bei dem zweiten um ein Tier, das 6 Tage gehungert hatte, bei dem durch einen 3 maligen Aderlaß 157 ccm Blut entleert wurden. Bei beiden Tieren waren die Blutzuckerwerte zu Beginn des Versuches trotz des langen Hungerns vollständig normal (0,10 $^0/_0$).

Im Versuch 17 trat nach dem I. Aderlaß eine geringe Hypoglykämie auf (0,08 $^0/_0$), was wir in den vorhergehenden Versuchen nie gesehen haben. (Mit Rücksicht darauf, daß wir den Wert von 0,08 $^0/_0$ nie beobachteten, glauben wir ihn bereits als hypoplykämisch ansprechen zu dürfen; der Durchschnittswert beträgt nach Bang 0,10 $^0/_0$.) Nach dem II. Aderlaß kommt es zu einer leichten Steigerung, die nach 2 Stunden zu einer stärkeren Hypoglykämie führt (0,06 $^0/_0$), der III. Aderlaß bewirkt eine Zunahme der Blutzuckerkonzentration auf 0,14 $^0/_0$, die im Verhältnis zu der kurz vorher bestehenden Hypoglykämie nicht unbeträchtlich ist, der IV. Aderlaß hat schließlich ähnlich wie in den Versuchen an nicht hungernden

Tieren die größte Steigerung zur Folge (0,17 %), jedoch ist auch sie im Vergleich zu jenen Werten, die wir nach Entfernung solcher Mengen Blutes sonst erhielten, eine verhältnismäßig geringe, da wir hier gewöhnlich eine Blutzuckersteigerung bis mindestens 0,24 % beobachten konnten. Nach dem IV. Aderlaß fällt der Blutzuckergehalt auf den normalen Wert, ein hypoglykämischer Wert ist selbst 4 Stunden nach dem Aderlaß nicht zu konstatieren.

Versuch 17.

Männliches Kaninchen, Gew. 3700 g. Hungert 5 Tage.
129 ccm Aderlaß.

Zeit		Blutz. %	Harnz. %
9^{30}	Blutentnahme zwecks Untersuchung	0,10	
9^{40} bis 10^{00}	I. Aderlaß 30 ccm Ohrvene. Tier erregt.		
10^{30}	Blutentnahme Ohrvene	0,09	
11^{15}	" "	0,08	
12^{00}	" "	0,09	
12^{05} bis 12^{25}	II. Aderlaß 32 ccm Ohrvene.		
12^{30}	Blutentnahme Ohrvene	0,14	0
1^{00}	" "	0,11	
1^{30}	" "	0,11	
2^{30}	" "	0,06	
2^{50} bis 3^{12}	III. Aderlaß 35 ccm Ohrvene. Tier ruhig.		
3^{15}	Blutentnahme Ohrvene	0,14	
3^{45}	" "	0,10	
4^{15}	" "	0,11	
5^{00}	" "	0,10	
5^{30} bis 5^{50}	IV. Aderlaß 32 ccm Ohrvene.		
5^{50}	Blutentnahme Ohrvene	0,17	
6^{30}	" "	0,14	
7^{00}	" "	0,13	0
7^{50}	" "	0,13	
8^{45}	" "	0,10	
10^{00}	" "	0,09	

Im Versuch 18 gestalten sich die Verhältnisse etwas ähnlich, jedoch hat hier die größere Blutentnahme ein höheres

Ansteigen der Blutzuckerkonzentration zur Folge. Der I. Aderlaß von 53 ccm bewirkt eine geringe Zunahme des Blutzuckergehaltes (0,13 %), führt aber auch hier nach einiger Zeit zu dem leicht hypoglykämischen Wert von 0,08 %; schon der II. Aderlaß von 55 ccm bewirkt einen Anstieg auf 0,18 %. Nach $2^1/_2$ Stunden ist der normale Wert von 0,12 % wieder erreicht, der durch einen erneuten Aderlaß von 49 ccm bis auf 0,27 % gesteigert wird (ohne Glucosurie).

Hierin ist unser Versuch den bei nicht hungernden Tieren angestellten schon sehr ähnlich. Wir müssen aber berücksichtigen, daß die starke Steigerung auf die große Menge des entnommenen Blutes (157 ccm) zu beziehen ist, eine Menge, wie sie in den anderen Versuchen nicht erreicht wurde.

Auffallend ist, wie langsam der letzte hohe Anstieg auf 0,27 % erfolgt und wie lange es dauert, bis der Blutzuckergehalt auf den noch etwas erhöhten Wert von 0,14 % sinkt.

Versuch 18.

Weibliches Kaninchen. Hungert 6 Tage.

157 ccm Aderlaß.

	Blutz. %	Harnz. %
10^{00} Blutentnahme Ohrvene zwecks Untersuchung	0,10	0
10^{50} bis 11^{10} I. Aderlaß 53 ccm Ohrvene und Arterie.		
11^{15} Blutentnahme Ohrvene	0,13	
11^{45} " "	0,10	
12^{30} " "	0,09	
1^{30} " "	0,11	
2^{30} " "	0,08	
2^{40} bis 2^{55} II. Aderlaß 55 ccm Ohrvene und Arterie.		
2^{58} Blutentnahme Ohrvene	0,18	
3^{30} " "	0,14	
4^{00} " "	0,12	
4^{30} " "	0,13	
5^{30} " "	0,12	
5^{50} bis 6^{05} III. Aderlaß 49 ccm Ohrvene und Arterie.		
6^{10} Blutentnahme Ohrvene	0,22	

6^{40}	Blutentnahme Ohrvene	0,22	
7^{10}	" "	0,23	
7^{40}	" "	0,25	
8^{30}	" "	0,27	0
9^{30}	" "	0,18	
10^{45}	" "	0,14	

Aus beiden Versuchen geht hervor, daß der Blutzuckergehalt von Tieren, die längere Zeit gehungert haben, ein normaler ist, daß die Aderlaßhyperglykämie beim Hungertier selbst nach großen Aderlässen eine relativ geringe ist, daß diese Hyperglykämie bisweilen eine spätere Hypoglykämie zur Folge haben kann, daß jedoch auch dann durch einen entsprechend großen und wiederholten Aderlaß der Blutzuckergehalt auf über 0,25 % gebracht werden kann, ferner daß die Hyperglykämie länger andauert als beim nicht hungernden Tier. Letzteres geht deutlich aus Versuch 18 hervor, bei dem die Hyperglykämie nach dem III. Aderlaß ca. 4 Stunden anhält.

Hierin stimmen unsere Beobachtungen mit denen I. Bangs[1]) überein, der ebenfalls langsames Ansteigen der Hyperglykämie und langes Andauern derselben konstatieren konnte. Daß die Aderlaßhyperglykämie beim hungernden Tier geringer ist als beim gut genährten, konnten außerdem Schenck und Quinquaud (zit. nach Bang) feststellen.

Überblicken wir die Resultate unserer Versuche, so sehen wir, daß nach einem einzigen Aderlaß, selbst wenn er ein kräftiger ist und wie im Versuch 2 die Menge von 100 ccm Blut erreicht, höchstens eine unbeträchtliche Hyperglykämie eintritt. Ein Ansteigen vom Normalwert auf 0,15 % ist fast immer zu beobachten, doch ist dieser Anstieg bei einem so empfindlichen Tier, wie es das Kaninchen ist, vielleicht doch auf leichte psychische Erregung, die ja mit jeder Manipulation am Versuchstier verbunden ist, zu beziehen.

Auch nach dem II. Aderlaß ist die Zunahme der Blutzuckerkonzentration keine beträchtliche, sie übersteigt in 13 Versuchen an gesunden Tieren nur zweimal die Grenze von 0,20 % in Versuch 5 und 7. In Versuch 5 waren jedoch mit dem

[1]) I. Bang, Der Blutzucker. S. 111. Wiesbaden 1913.

II. Aderlaß bereits 90 ccm Blut entnommen. Wir werden sehen, daß dies für die Blutzuckersteigerung nicht ohne Bedeutung ist.

Betrachten wir die Resultate anderer Untersucher, so vor allem die Resultate von Rose[1]) und Schenck[2]) nach zwei Aderlässen, so sehen wir, daß unsere Ergebnisse bezüglich des Blutzuckeranstieges denen dieser Autoren ziemlich nahe kommen. Dabei ist aber zu berücksichtigen, daß unsere Aderlässe in den meisten Fällen größer waren, daß wir zwischen zwei Aderlässen immer einen längeren Zeitabschnitt als 10 bis 15 Minuten (im Gegensatz zu Schenck) verstreichen ließen, und daß das Blut nicht wie bei Rose und Schenck aus der Carotis entnommen wurde. Zum Vergleich seien die Zahlen von Rose und Schenck kurz angeführt.

Rose.

	Blutmenge	Blutzucker %	Zeit zwischen beiden Aderl. Std.	Blutmenge	Blutzucker %
1. Zuckertier . .	30,9	0,088	1	30,0	0,106
2. Rübentier . .	37,0	0,092	1 1/2	35,2	0,150
3. Zuckertier . .	32,8	0,101	1 3/4	45,3	0,139
4. „ . .	25,0	0,080	2 1/2	31,5	0,112
5. „ . .	41,0	0,109	3	35,6	0,126
6. „ . .	28,0	0,098	4	41,1	0,099

Schenck.

	Blutmenge	Blutzucker %	Zeit zwischen beiden Aderl. Min.	Blutmenge	Blutzucker %
1. Zuckertier . .	21,8	0,068	10—15	27,5	0,142
2. Rübentier . .	27,0	0,082		26,0	0,161
3. Zuckertier . .	24,7	0,083		30,1	0,150
4. „ . .	29,7	0,116		28,7	0,160
5. „ . .	22,4	0,139		23,5	0,217
6. „ . .	22,2	0,160		25,1	0,218

Zunahme des Blutzuckergehaltes um das Doppelte bis Dreifache nach 3maligem Aderlaß bei so geringen Blutentnahmen (20 bis 25 ccm), wie Lewandowski[3]) sie vorgenommen hat, konnten wir niemals beobachten. Bei seinen Versuchen scheint die psychische Hyperglykämie für die beträchtliche Blutzucker-

[1]) Rose, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **50**, 15, 1903.
[2]) Schenck, Arch. f. d. ges. Physiol. **57**, 553, 1894.
[3]) Lewandowski, Du Bois-Reymonds Archiv **1901**, 365.

steigerung nach den Aderlässen verantwortlich gemacht werden zu dürfen. Beachtenswert ist, daß er trotz der hohen Hyperglykämie bis 0,31 % keine Glucosurie nachweisen konnte. Sein Einwand gegen Biedl und Kolisch[1]) wegen der Nichtbeachtung der Aderlaßwirkung bei ihren Phlorizinversuchen ist nach unseren Ergebnissen nicht begründet. Es besteht deshalb auch sein Schlußsatz, daß „alle Methoden, die zwecks vergleichender Blutzuckerbestimmungen beim Kaninchen mit größeren, bald nacheinander vorgenommenen Aderlässen arbeiten, unbrauchbar sind", nicht vollständig zu Recht. Denn wir haben gesehen, daß man beim Kaninchen 7 mal Blut in einer Menge von 15 bis 20 ccm und in einer Gesamtmenge von 118 ccm in der Zeit von 6 Stunden entnehmen kann, ohne daß eine Steigerung des Blutzuckergehaltes über 0,15 % bei 0,12 % Anfangswert eintritt.

Auch Erlandsen[2]) hat beim Kaninchen konstant nach dem Aderlaß eine Hyperglykämie gefunden, die ihr Maximum ca. $^1/_2$ Stunde nach dem Aderlaß erreichte. „Zu diesem Zeitpunkt betrug die Blutzuckerkonzentration ca. 0,33 %", also 3 mal soviel wie vor dem Aderlaß. Seiner Ansicht, daß die Größe der Blutzuckersteigerung von der Menge des entnommenen Blutes unabhängig zu sein scheint, können wir uns auf Grund unserer Versuche nicht anschließen.

Einen beträchtlichen Anstieg des Blutzuckergehaltes nach dem II. Aderlaß bis auf 0,32 % und 0,37 % bei einer Gesamtblutentnahme von 54,9 ccm bzw. 61,8 ccm Blut konnte Andersson[3]) konstatieren, jedoch konnte auch er schon in zwei Versuchen, in denen er den I. Aderlaß aus der Ohrvene und erst den II. Aderlaß aus der Carotis gemacht hatte, eine geringere Blutzuckervermehrung als in den meisten übrigen Versuchen feststellen.

Die Untersuchungen von mir und Reinbach über Fesselungs- und Narkosehyperglykämie beim Kaninchen, sowie die Ergebnisse Jacobsens[4]) hatten schon I. Bang[5]) an dem Be-

---

[1]) Biedl und Kolisch, Verhdl. d. 18. Kongr. f. inn. Med. 1900, 573.
[2]) Erlandsen, diese Zeitschr. 23, 329, 1910.
[3]) Andersson, diese Zeitschr. 12, 1, 1908.
[4]) Jacobsen, diese Zeitschr. 51, 443, 1913.
[5]) I. Bang, diese Zeitschr. 58, 236.

stehen einer echten Aderlaßhyperglykämie zweifeln lassen. So konnte Bang in der Tat bei Kaninchen, bei denen die psychische Hyperglykämie durch Urethan-Äthernarkose ausgeschaltet war, nach Aderlaß aus der Carotis eine bedeutend geringere Hyperglykämie nachweisen als bei nicht narkotisierten.

Bei Blutentnahme aus der Ohrvene war jedoch in drei Versuchen eine Blutzuckersteigerung nach Aderlaß (21 ccm, 13 ccm, 50 ccm) überhaupt nicht wahrzunehmen. Hierin stimmen die Ergebnisse Bangs vollkommen mit den unsrigen nach einem Aderlaß überein, selbst wenn, wie in den Versuchen Bangs, die Blutentnahme aus der Ohrvene etwas länger dauerte.

Anders liegen die Verhältnisse aber, wenn ein großer Aderlaß wiederholt wird.

Erst wenn es zu mehrfachen größeren Blutentnahmen kommt, wenn wirklich die Gesamtblutmenge eine starke Verminderung und bedeutende Änderung in Konzentration und Zusammensetzung erfährt, tritt die richtige Aderlaßhyperglykämie in Erscheinung. Daß diese Hyperglykämie mit psychischer Erregung nichts zu tun hat, geht schon daraus hervor, daß sie nach dem erstmaligen Aderlaß, wenn also der Blutverlust noch kein hochgradiger ist, nicht auftritt, und daß sie auch nach wiederholten kleinen Aderlässen fehlt. Gerade die Art des Eintrittes, des An- und Abstieges der Blutzuckerkurve spricht unseres Erachtens gegen die Annahme einer psychischen Hyperglykämie. Wenn wir uns über den Mechanismus der Blutzuckersteigerung nach wiederholten Aderlässen eine Vorstellung bilden dürfen, so gelangen wir zu der Annahme, daß der Verlust größerer Blutmengen einen Reiz auf die an der Blutbildung beteiligten Organe (Milz, Knochenmark, Leber usw.) ausübt und daß es zugleich mit und durch diesen Reiz und der Aufnahme größerer Wasser- und Salzmengen aus den Geweben in die Blutbahn zwecks Ersatz der in Verlust geratenen Blutbestandteile zu einer Ausschwemmung von Reserveglykogen aus der Leber und vielleicht auch den Muskeln in die Blutwege kommt. Ist dann ein voller Ausgleich in Wasser- und Salz- bzw. Zuckerzufuhr zwischen Blut und Geweben eingetreten und damit das frühere Spannungsniveau im Blut wieder hergestellt, so ist auch der Blutzucker dementsprechend wieder auf die Norm gesunken. Beim Hungertier hat dieser Ausgleich infolge ungenügenden

Glykogenvorrates seine Schwierigkeit und führt im Anfang zur Hypoglykämie; jedoch hält auch diese nur kurze Zeit an, denn der Blutzucker stellt sich, wenn nicht neue Blutentziehungen vorgenommen werden, alsbald wieder auf den normalen Wert ein.

Wir müssen also die vorübergehende Glykogenausschwemmung in das Blut und die dadurch bedingte Blutzuckererhöhung als eine Teilerscheinung der Blutregeneration nach Aderlaß auffassen.

Deutlich tritt hier wieder das Bestreben des Organismus hervor, die Verluste möglichst schnell zu ersetzen und die früheren normalen Verhältnisse wieder herzustellen, wie wir das in ähnlicher Weise bei experimenteller Salzzufuhr beobachten[1]). Der Zucker ist als einer jener Bestandteile des Blutes anzusehen, bezüglich dessen seitens des Blutes die Tendenz besteht, nach Verlust und folgender gesteigerter Produktion möglichst rasch den Normalwert wieder einzustellen.

Denn wir konnten bei Untersuchungen des Blutes, die einen Tag und mehrere Tage nach dem Aderlaß stattfanden, beobachten, daß trotz der schwersten Veränderungen in der Zusammensetzung des Blutes, wie starker Verminderung der roten Blutkörperchen und des Hämoglobins und Auftretens von Poikylocytose, polychromatophyler Degeneration, Normoblasten und Myeloblasten usw., der Blutzuckergehalt immer vollständig normal war. Nur wenn die schädliche Noxe dauernd fortbesteht, hält auch die Blutzuckersteigerung weiter an, bis schließlich bei erhöhtem Blutzuckergehalt der Tod des Organismus infolge der dauernden Schädigung eintritt.

Wir wollen noch kurz auf das vollständige Fehlen von Zucker im Harn zurückkommen, das von vielen Autoren trotz hochgradiger Hyperglykämie beobachtet wurde. Wir selbst fanden in einigen Versuchen geringe Mengen Zucker im Harn, in anderen, in denen auf Grund des Blutzuckergehaltes Harnzucker zu erwarten war, wurde er vermißt. Auch in dem Hungerversuch 18 wurde trotz länger andauernder, starker Hyperglykämie kein Zucker im Harn konstatiert.

Es liegt nun nahe, das Fehlen des Harnzuckers auf den

---

[1]) E. Münzer, Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 41.

sofortigen Verbrauch des ausgeschwemmten Zuckers bei herabgesetzter Diurese zurückzuführen. Stärkere Hyperglykämie führt unter gesteigerter Diurese zu Glucosurie, und es besteht ein enger, wahrscheinlich unmittelbar notwendiger Zusammenhang zwischen Glucosurie und Polyurie, die zum Teil als Salzdiurese aufzufassen ist.

Nach großen Aderlässen findet zunächst eine starke Wasserabgabe aus den Geweben in das Blut statt, also eine Verdünnung des Blutes mit relativ geringerem Gesamtsalzgehalt und geringerer diuretischer Kraft; dementsprechend lassen nach größeren Aderlässen die Tiere oft innerhalb 48 Stunden keinen Harn und die Blase wird auch bei öfterem Katheterisieren bzw. Abdrücken vollständig leer gefunden.

Zusammenfassung.

1. Ein einmaliger großer Aderlaß, worunter wir einen Aderlaß von mindestens 50 ccm verstehen, hat bei einem gesunden, kräftigen, gut genährten Kaninchen keine bzw. eine nur unbedeutende Blutzuckersteigerung zur Folge.

2. Der wiederholte große Aderlaß führt ohne Ausnahme zu einer Blutzuckersteigerung, die den Wert von 0,24 bis 0,31 % erreichen kann. Hierbei handelt es sich weniger um die Zahl der Aderlässe als um die Menge des auf einmal entnommenen Blutes. Beweisend hierfür ist unter anderem, daß

3. wiederholte kleine Aderlässe (10 bis 20 ccm), selbst wenn sie in ihrer Gesamtmenge, wie z. B. in Versuch 13, 118 ccm Blut ausmachen, nicht zur Hyperglykämie führen.

4. Die Erhöhung des Blutzuckerspiegels findet schon während oder kurz nach dem Aderlaß statt, der höchste Blutzuckerwert ist in ca. 45 Minuten, der Abfall auf einen Wert, der dem Anfangswert nahe kommt, in ca. 2 bis 3 Stunden erreicht.

5. Durch frühere Blutentnahmen geschwächte und anämische Tiere reagieren schon auf einen größeren Aderlaß mit beträchtlicher Blutzuckersteigerung, wieder ein Beweis dafür, daß die Menge des entzogenen Blutes für die Erhöhung des Blutzuckergehaltes ausschlaggebend ist.

6. Bei Tieren, die 5 bis 6 Tage gehungert haben, hat der wiederholte Aderlaß ebenfalls ein deutliches Ansteigen der Blut-

zuckerkurve zur Folge. Diese Hyperglykämie scheint, wenn nicht gerade sehr große Blutmengen entnommen werden, geringer als beim normal ernährten Tier zu sein. Bemerkenswert ist, daß hier die ersten Aderlässe zu einer Hypoglykämie führen und daß die Hyperglykämie erst eintritt, wenn die entnommenen Blutmengen sehr beträchtliche sind, daß ferner die Hyperglykämie langsamer eintritt, dafür aber länger andauert.

7. Bei dem mit Kohlenhydraten überfütterten Tier ist der Eintritt der Blutzuckersteigerung nach Aderlaß erleichtert, die Hyperglykämie ist eine entsprechend höhere und von Glucosurie gefolgt.

8. Das Entstehen von Glucosurie, die zwar geringgradig ist, in einigen Fällen jedoch sicher konstatiert wurde und bei einem Blutzuckergehalt von ca. 0,27 % eintritt, erscheint durch den raschen Verbrauch des gebildeten Zuckers und infolge mangelnder Diurese erschwert.

9. Es ist anzunehmen, daß die ausgelöste Zuckerproduktion dadurch zustande kommt, daß die Verminderung der Blutmenge den Reiz darstellt, während der experimentelle Eingriff als solcher unter den Maßnahmen, wie er von uns ausgeführt wurde, für das Entstehen der Hyperglykämie außer Betracht kommt. Je größer die Blutentziehung ist, desto größer ist der Reiz und dementsprechend die Zuckerbildung bzw. -einschwemmung. Dennoch ist das stetige Bestreben der Blutzuckerkonzentration zu erkennen, sich so schnell als möglich wieder auf das normale Niveau einzustellen.

10. Eine Abhängigkeit der Aderlaßhyperglykämie von dem Blutzuckeranfangswert insofern, als die Hyperglykämie um so kleiner sein soll, je größer der Zuckergehalt des Blutes von vornherein war (Schenck), besteht nicht.

Beitrag zur Kenntnis der chemischen Natur einiger Enzyme.

Von

Th. Bokorny.

(Eingegangen am 31. März 1915.)

Es gibt kaum irgendwo in der jetzigen Physiologie eine größere Unsicherheit der wissenschaftlichen Erkenntnis als auf dem Gebiete der Enzyme, und besonders problematisch erscheint gegenwärtig noch die rein chemische Seite dieser merkwürdigen Stoffe.

Man hat sie als katalytische Substanzen erklärt, wohl mit Recht, da sie eine unbegrenzte Wirksamkeit besitzen und sich bei ihrer Wirksamkeit nicht verändern. Damit sind die Enzyme eingereiht in eine physikalische Rubrik der Chemie. Das chemische Wesen ist damit nicht erklärt.

Es handelt sich weiter darum, ob sie zu den Eiweißstoffen oder zu einer anderen chemischen Gruppe der organischen Chemie zu zählen sind.

Viele nehmen das erstere an, wobei aber zugegeben wird, daß die chemische Analyse der Enzyme nicht auf sicherer Basis steht, da die Reinherstellung der Enzyme große Schwierigkeiten macht. Wer kann sagen, daß er ein reines Enzym in Händen gehabt habe? Es fehlt das Kriterium der Reinheit. Die enorme Wirksamkeit, die z. B. in der Fähigkeit des Labfermentes, eine viel tausendfach größere Menge von Milch zur Gerinnung zu bringen, sich zeigt, dürfte kein Beweis für die Reinheit, sondern nur ein solcher für größere Reinheit gegenüber anderen Präparaten sein.

Ferner fehlt es nicht an Stimmen, die für verschiedenartigen chemischen Charakter der Enzyme, so daß die einen zu den Eiweißstoffen, die anderen zu den Kohlenhydraten usw. zu rechnen wären, plädieren.

Alte Beobachter, wie Liebig, Robiquet, hielten ohne weiteres die Enzyme für „albuminoide Substanzen“.

Später hingegen traten viele Forscher sehr energisch dagegen auf; besonders Hüfner für das Pankreatin (Trypsin), Wurtz für das Papain, Barth und Zulkowski für die Diastase.

Sie stützten sich dabei hauptsächlich auf die von den Eiweißkörpern sehr abweichenden Analysenzahlen.

Indes waren damals die Präparate noch so unrein, daß man kein großes Gewicht auf jene Analysen legen darf.

Besonders O. Loew hat diese Befunde kritisiert und darauf hingewiesen, daß die saccharifizierenden Enzyme stets mit Kohlenhydraten, namentlich Gummistoffen und Dextrinen verunreinigt sind, was nicht nur sehr störend auf die gefundenen Analysenzahlen, sondern auch auf die Untersuchung der Spaltprodukte wirken mußte.

So führte O. L. aus, daß der Befund von Barth, den dieser gegen die Eiweißnatur der Invertase geltend gemacht hatte (kein Leucin bei Spaltung mit Schwefelsäure), sich dadurch erklärt, daß etwa vorhandenes Leucin aus dem entstandenen zuckerhaltigen Sirup nicht auskrystallieren konnte.

Er selbst erhielt von der Diastase ein reineres Produkt, das die Reaktionen der Peptone (Propeptone) zeigte. Er nahm für die Enzyme im allgemeinen nicht bloß die Eiweißnatur, sondern die der „aktiven Eiweißstoffe“ in Anspruch.

Sie sind nach ihm aus Protoplasmaeiweiß durch Depolymerisierung entstanden, bei der von zwölf Aldehydgruppen des Protoplasmaeiweißes nur zwei bis drei übrigbleiben.

Er versuchte dann den Nachweis freier Aldehydgruppen in den Enzymen und zeigte, daß aktives Pankreasferment mit neutralem Silberoxyd intensive Schwärzung ergibt, während gekochte, also inaktivierte Enzymlösungen nur eine sehr schwache Bräunung unter denselben Bedingungen zeigen.

In neuester Zeit hat O. Loew seine Ansicht dahin modifiziert, daß es sich wahrscheinlich um Ketongruppen handelt; denn hochverdünnte alkalisehe Silberlösungen liefern mit Enzymen bei gewöhnlicher Temperatur keine Metallabscheidung. Es kann sich also nur entweder um polymerisierte Aldehydgruppen oder um die den Aldehydgruppen so nahe verwandten

Ketongruppen handeln. Ketone wie Aldehyde addieren Blausäure. Diese äußert bekanntlich auf viele Enzyme eine hemmende (lähmende) Wirkung. Wird die freie Blausäure wieder entfernt, so ist auch die Aktivität der Enzyme wieder hergestellt. Diese Erscheinung ist so zu erklären, daß eine vorhandene Ketongruppe lockere Verbindung mit Blausäure eingeht, die sehr leicht wieder aufgehoben wird. Konzentrierte Blausäure, z. B. von 25 %, tötet allerdings die Pankreasdiastase, aber noch nicht das Pankreastrypsin[1]).

Nun reagieren Ketongruppen (wie Aldehydgruppen) bekanntlich leicht in neutraler Lösung und selbst bei hoher Verdünnung mit Hydrazin, Methyl- und Phenylhydrazin, ferner mit Hydroxylamin, wobei Verbindungen entstehen, die Hydrazone und Oxime (Ketoxime resp. Aldoxime) genannt werden.

Von diesem Standpunkte aus hat O. L. schon im Jahre 1888 die Einwirkung verdünnter neutraler Lösungen von freiem Hydroxylamin auf Diastase probiert und beobachtet, daß bei 24stündigem Stehen dieses Enzym unwirksam wird[2]). Später konstatierte er dieselbe Wirkung bei Katalase[3]).

1 g salzsaures Hydroxylamin, gelöst in 20 ccm Wasser und genau mit Soda neutralisiert, wurde mit zerriebenen, an Katalase reichen Tabaksblättern 18 Stunden bei 16 bis 18° stehen gelassen. Es war dann jede Spur der löslichen Katalase inaktiv geworden, während die unlösliche Form oder die α-Katalase noch teilweise unverändert war.

Phenylhydrazin schädigt bei gewöhnlicher Temperatur nach 24 Stunden α- und β-Katalase bedeutend, weniger das Emulsin.

K. Aso hat auf O. Loews Vorschlag einige weitere Versuche unternommen, und zwar nicht nur mit Hydroxylamin, sondern auch mit Hydrazin und Methylhydrazin.

Die sauer reagierenden Salze dieser Basen wurden mit Soda genau neutralisiert, aus dem abgewogenen ursprünglichen Salze wurde die Menge der freien Base berechnet. In diesen neutral reagierenden Lösungen wurden 0,5 bis 1 g Pepsin, Trypsin, Diastase oder Emulsin gelöst und diese Lösungen ebenso wie

[1]) O. Loew im Arch. f. d. ges. Physiol. 27.

[2]) Journ. f. pr. Chem. 37.

[3]) Catalase, a new enzym of generale occurrence, U. S. Dep. of Agricult. 1901, S. 29.

die Kontrollösungen (hier wurden einige Tropfen Äther zugesetzt, um Fäulnisvorgänge auszuschließen, bei den Hauptlösungen war dies unnötig, da wegen der starken Giftwirkungen jener Basen Bakterienentwicklung ohnehin unmöglich war) nach kürzeren oder längeren Zeiträumen wieder auf Aktivität geprüft. Die Resultate waren:

Hydrazin tötet in 1 %iger Lösung bei 40° in 2 Stunden Pepsin, Trypsin und Diastase vollständig, Emulsin nahezu vollständig in 8 Stunden.

Methylhydrazin schädigt in 0,032 %iger Lösung das Trypsin bei 40° in einer Stunde; es tötet in 0,32 %iger Lösung bei 24 bis 32° Diastase und Emulsin.

Man ersieht hieraus, daß unter der Wirkung dieser Basen die Enzyme in der Tat ihre Aktionsfähigkeit einbüßen.

Was die Zymase betrifft, so hat Wroblewski[1]) die Wirkung des Hydroxylamins beobachtet: „Nach dem Versetzen des aus Hefe ausgepreßten Saftes mit neutralisierter Lösung des salzsauren Hydroxylamins wird die Reaktion nach einiger Zeit sauer, und es entsteht ein Niederschlag, wobei die Gärfähigkeit des Saftes erlischt; dies geschieht nach dem Zusatz von 1,3 % des Reagens; nach einem Zusatz von 0,65 % desselben entsteht nur ein schwacher Niederschlag und die Gärfähigkeit wird geschwächt, aber nicht aufgehoben; 0,325 % Hydroxylamin ruft keinen Niederschlag hervor, und der Saft vergärt auch nur ein wenig schwächer wie bei der Vergleichsprobe."

Da Aldehydgruppen ausgeschlossen sind (wegen der Nichtreagierfähigkeit der Enzyme mit sehr verdünnter alkalischer Silberlösung), so scheinen die beobachteten enzymtötenden Einflüsse dieser Basen auf Ketongruppen zu deuten; denn polymerisierte Aldehydgruppen würden unter den angegebenen Bedingungen wohl kaum mit jenen Basen reagieren, sie müßten erst Depolymerisation erleiden. Da aber gewöhnliche Ketone in der Regel keine so leicht veränderliche Natur aufweisen als Enzyme, so hegt O. L. die Vermutung, daß in den Enzymen die Labilität der Ketongruppe durch gleichzeitig vorhandene Amidgruppen gesteigert wird.

Als Reagens auf Amidgruppen zog O. L. das Dicyan in Betracht.

---

[1]) Centralbl. f. Physiol. 1889, Heft 12.

Für das Protoplasma ist letzteres sehr giftig.

So wird z. B. Hefe durch frisch hergestellte wässerige Lösung von Dicyan binnen 24 Stunden völlig getötet.

Aber auch das Gärvermögen schwindet, die Zymase wird also auch getötet.

Pepsin, Trypsin, Emulsin und Diastase freilich sind weniger empfindlich gegen Dicyan, wie Aso gezeigt hat.

Eine recht charakteristische Wirkung auf Amidgruppen übt ferner auch die salpetrige Säure aus. Zunächst entsteht die Diazogruppe, die aber bei den Körpern der aliphatischen Reihe sofort weiter unter Stickstoffentwicklung in die Hydroxylgruppe übergeht.

Faktisch sind die Enzyme empfindlich dagegen. Nach Aso tötet salpetrige Säure von 0,2 % Pepsin in einer Stunde bei 40° 0,05 % das Trypsin in einer Stunde bei 40°, 0,05 % das Emulsin in 16 Stunden bei 18°.

Da auch Aldehyde mehr oder weniger leicht in labile Amidogruppen eingreifen, so wurden auch mit diesen die Enzyme geprüft, wobei aber zu erwähnen ist, daß viele frühere Untersuchungen schon vorlagen, als O. L. und seine Schule die Aldehydeinwirkung auf Enzyme prüften.

Es wurde übereinstimmend mit den früheren Untersuchungen gefunden, daß die Enzyme recht empfindlich gegen Aldehyde namentlich Formaldehyd sind, wodurch nach O. L. wiederum das Vorhandensein von labilen Amidogruppen wahrscheinlich gemacht wird.

O. L. erblickt in den angeführten Resultaten einen Beweis dafür, daß die Labilität der Enzyme auf labilen Atomgruppierungen, speziell auf gleichzeitiger Anwesenheit von Keton- und Amidogruppen beruhe.

Eine labile Atomgruppierung und infolgedessen ein intensiver atomarer Bewegungszustand (der als kinetische chemische Energie anzusprechen ist) wird als von O. Loew und seiner Schule für die Enzyme gefordert.

Obige Beobachtungen derselben können nur dann als Beweis für Amidoketonnatur der Enzyme gelten, wenn man annimmt, daß sich die betr. für Keton- bzw. Amidogruppen charakteristischen Reagenzien mit den Enzymen in der bezeichneten Weise verbinden, wofür freilich ein direkter Beweis bis jetzt

nicht erbracht wurde. Es müßte dann Hydrazin, Hydroxylamin, Dicyan, salpetrige Säure, Aldehyd usw. aus der Lösung verschwinden, nachdem die Enzyme in dieselbe gebracht wurden. Der Nachweis dieser interessanten Tatsache dürfte nicht zu den Unmöglichkeiten gehören.

Ich konnte der Frage wegen Mangel an genügenden Mengen der häufig recht kostspieligen Enzyme bis jetzt nicht nachgehen.

Vorläufig habe ich mich darauf beschränkt, bei einigen Enzymen eine Anzahl Versuche über Bindung von Basen, speziell Ammoniak, ferner von Säuren durch die Enzyme anzustellen und zum Vergleich auch einige bekanntere Eiweißstoffe heranzuziehen, da mir der Gedanke vorschwebte, die Enzyme müßten sich doch wohl ähnlich verhalten wie das Protoplasmaeiweiß, das ja Säuren und Basen bindet[1]).

Ich wählte zunächst die Diastase zu meinen Versuchen. Davon hatte ich verschiedene Präparate, ältere und neuere.

Eines der ältesten Präparate, das ich vor ca. 15 Jahren von einer Handlung bezogen hatte, wurde zuerst untersucht.

Es stellte ein gelbliches Pulver dar, das sich in Wasser schwer löste, beim Verbrennen Horngeruch gab. In 1%igem Ammoniak löste sich das Präparat zum Teil mit roter Farbe auf, der Rückstand nahm eine schleimige Beschaffenheit an.

Versuch 1 (Vorversuch).

2 g dieser Diastase wurden mit 20 ccm einer Normal-Ammoniaklösung (in Zukunft immer als n-Ammoniak bezeichnet), d. i. mit einer 1,7%igen Ammoniaklösung, gemischt und in einem bedeckten Gefäße einige Stunden stehen gelassen. Es bildete sich eine schlammige, unfühlbare Masse aus dem ursprünglich feinsandigen Präparat. Etwas ging auch in Lösung, denn die Flüssigkeit nahm eine braunrötliche Farbe an. Man bemerkte bald, schon nach einer Stunde, eine Abnahme des ammoniakalischen Geruches.

Wurde der Diastaseschlamm nach sorgfältigem Auswaschen für sich (nur unter etwas Wasserzusatz) gekocht, so ergab sich kein ammoniakalischer Geruch, wohl aber wenn unter Zusatz

[1]) Siehe Verf. in Arch. f. d. ges. Physiol. 1914.

von einigen Tropfen Natronlauge gekocht wurde. Das schien mir auf eine chemische Bindung des Ammoniaks durch die Diastase hinzuweisen.

Versuch 2.

1 g Diastase von demselben Präparat wie bei Versuch 1 wurde mit 10 ccm n-Ammoniak zusammengebracht und im bedeckten Glase 12 Stunden lang stehen gelassen. Dann wurde filtriert und das Filtrat mit n-Schwefelsäure titriert. Es ergab sich, daß nur 4 ccm n-Schwefelsäure zum Umschlag von Lackmusblau in Rot, also zur Neutralisation, nötig waren. Demnach war eine 6 ccm n-Ammoniak entsprechende Ammoniakmenge, d. i. $6 \times 0{,}017 = 0{,}102$ g Ammoniak, verschwunden und offenbar von 1 g der Diastasemenge gebunden worden. Die Diastase[1]) vermochte also 10,2% NH_3 (ihres Gewichtes) chemisch zu binden.

Versuch 3.

Um die nötige Dauer der Einwirkung auszuprobieren, wurde nochmals ein Versuch wie 2 aufgestellt, nur dauerte diesmal die Einwirkung des n-Ammoniaks auf die Diastase nur $^1/_2$ Stunde. Die Titration ergab dann, daß erst eine 4 ccm n-Ammoniak entsprechende NH_3-Menge absorbiert worden war. Man darf also die Versuchsdauer nicht zu kurz bemessen, sonst verbindet sich das Ammoniak nicht vollständig, entweder weil dasselbe in die Diastasekörnchen langsam eindringt oder weil die Verbindung überhaupt langsam vonstatten geht.

In der Folge wurde die Einwirkung immer mindestens 2 bis 3 Stunden fortgesetzt.

Versuch 4.

1 g Diastase, von demselben Präparat wie bei Versuch 1 bis 3, wurde mit 10 ccm n-Natronlauge (d. i. 4%iger Lauge) vermischt und 12 Stunden stehen gelassen. Die Flüssigkeit nahm eine rote Farbe an. Offenbar war etwas in Lösung gegangen. Doch zeigte sich der größere Teil der Diastase noch als ungelöster schleimiger Rückstand, der beim Austrocknen hart wurde.

---

[1]) Ein ähnliches Resultat erhielt ich auch bei einem neuen, höchstens $^1/_2$ Tag alten Diastasepräparat von Grübler.

Die titrimetrische Bestimmung ergab, daß 4,4 $\times$ 0,04 = 0,17 g Natriumhydroxyd verbraucht worden, d. h. in chemische Bindung mit dem Enzym eingetreten waren. Das macht 17 % des Gewichtes der angewandten Diastase.

Versuch 5.

1 g Diastase wurde mit 10 ccm n-Schwefelsäure vermischt. Nach 2stündigem Stehen des Versuches ergab die Titration der filtrierten Flüssigkeit, daß sämtliche Schwefelsäure noch vorhanden war. Es hatte also keine Bindung der Schwefelsäure stattgefunden.

Somit unterscheidet sich die Diastase von dem Protoplasmaeiweiß dadurch, daß sie keine Schwefelsäure zu binden vermag (aus 4,9 %iger Lösung).

In einer jüngst erschienenen Arbeit über Bindung der Gifte durch das Protoplasma habe ich gezeigt, daß die Schwefelsäure, als n-Lösung dargeboten, in beträchtlicher Menge von der Hefe gebunden wird.

Es wurden damals 20 g Hefe (Preßhefe, frisch) mit 100 ccm n-Schwefelsäure gut zusammengemischt.

Man hat dabei darauf zu achten, daß von der Hefe keine Knöllchen bleiben, weil die Säure in diese nicht eindringen würde.

Das sieht man namentlich dann sehr deutlich, wenn gefärbte Lösungen zur Anwendung kommen, deren Farbstoff absorbiert wird.

Oder auch dann, wenn durch das Reagens auf chemischem Wege eine Färbung der Hefesubstanz selbst eintritt.

Verschiedene Forscher haben schon auf diesen Punkt aufmerksam gemacht.

Dann wurde die Flüssigkeit mit der Hefe in einem Becherglase ruhig 24 Stunden lang stehen gelassen.

Nach dieser Zeit war die Hefe völlig abgesetzt.

Durch die Abtötung war natürlich die Schwefelsäure etwas verdünnt worden. Denn das Hefewasser hatte sich damit vermischt; das anhängende Wasser und die Vakuolenflüssigkeit, die durch das Absterben der Plasmahaut austreten konnte, sind zusammen das austrittfähige Wasser der Preßhefe, wahrscheinlich ist auch noch etwas Imbibitionswasser aus dem Plasma dazu zu rechnen,

da beim Abtöten mit Säuren eine Gerinnung der gerinnbaren Proteinstoffe eintritt und damit die Quellung geringer oder ganz aufgehoben wird.

Ich schätze die erfolgte Verdünnung auf höchstens 10 %.

Die Titration ergab: 10 ccm der zum Versuch verwendeten Schwefelsäure erforderten nur 7,5 ccm Normalnatronlauge zur Neutralisation.

Es hatte also eine beträchtliche Abnahme der Acidität stattgefunden.

Die Versuchsflüssigkeit wurde nun noch weitere 2 Tage stehen gelassen.

Dann abermals Titration.

Es zeigte sich keine weitere Abnahme des Säuregehaltes.

Auf 7,5 ccm der Normallauge kommen also 10 ccm der Versuchsflüssigkeit.

Da aber eine etwa 10 %ige Verdünnung durch das Hefewasser stattgefunden hat, so würden 7,5 ccm Normallauge schon aus diesem Grunde mehr als 7,5 ccm der Versuchsschwefelsäure nach dem Versuch zur Neutralisation beansprucht haben, nämlich $7{,}5 + 0{,}75 = 8{,}25$ ccm n-Schwefelsäure.

Es sind also nur 1,75 ccm Säureabnahme auf 10 ccm Versuchsflüssigkeit zu rechnen.

Das macht $17{,}5 \times 0{,}049 = 0{,}86$ g Schwefelsäure.

0,86 g Schwefelsäure sind aus 100 ccm Normalschwefelsäure durch 20 g Preßhefe binnen 24 Stunden (oder auch binnen 72 Stunden) bei gew. Temperatur gebunden worden aus 4,9 %iger Lösung. Das macht gegen 13 % von dem Gewicht der trocknen Hefe.

Es ist gewiß keine zufällige Übereinstimmung zwischen Protoplasmaeiweiß und Enzym, daß beide recht erhebliche Mengen von Basen zu binden vermögen.

Unter Bindung darf man sich hier keinen physikalischen Vorgang denken, denn sonst müßte durch bloßes Auskochen mit Wasser das Ammoniak entfernt werden können.

Das ist aber nicht der Fall.

Man erhält erst dann den Ammoniakgeruch, wenn man einige Tropfen starke Natronlauge zu dem Wasser, in dem gekocht wird, zusetzt.

Versuche über die Eiweißnatur meiner Diastase.

Versuch 6.

1 g Diastase wurde mit 20 ccm Wasser und einer Spur Pepsin vermischt und dann 24 Stunden bei 20° stehen gelassen.

Es zeigte sich nun deutlicher Verdauungsgeruch. Die Lösung gab mit Phosphorwolframsäure einen starken Niederschlag, hingegen keinen solchen mit gesättigter Zinkvitriollösung und nur schwache Opalescenz mit gesättigter Ammoniaksulfatlösung. Somit war Pepton gebildet worden.

Von der ursprünglich unslöslichen Diastase war das meiste in Lösung gegangen.

Nur ein ziemlich kleiner Rest war noch übriggeblieben als feiner Bodensatz.

Wegen der geringen Menge unterblieb eine weitere Untersuchung des Restes.

Versuch 7.

Eine kleine Menge Diastase wurde auf einem Platinblech erhitzt. Sie verkohlte unter Aufblähen und ergab den bekannten Geruch nach verbranntem Horn.

Somit stimmen diese zwei wichtigen Eiweißreaktionen auf die vermutete Eiweißnatur meiner Diastase. Freilich kann immer der Einwand gemacht werden, daß ja die Diastase nicht rein und das Eiweiß nur Beimengung war.

Ein Versuch über Farbstoffabsorption (mit Methylviolett) ergab, daß 1 g Diastase aus 20 ccm Farbstofflösung (0,25 % Methylviolett) sehr viel Farbstoff fortnimmt (absorbiert!), so daß die Diastase tief gefärbt, die Lösung viel schwächer gefärbt erscheint.

Versuche über Basen- und Säurebindung durch zweifellose Eiweißstoffe.

Bei Hefeversuchen habe ich gefunden, daß beträchtliche Mengen von Basen sowohl wie auch von Säuren durch dieselbe gebunden werden.

Ich bezog diese Bindung auf das Hefeeiweiß, weil kaum eine andere Auffassung möglich war.

Denn in der Hefe kommt sonst kein Stoff in solcher Menge vor, daß man die Bindung[1]) von Säuren und Basen, die in so

[1]) Die Bindung hochkonzentrierter Säuren, wie starker Salpetersäure, durch Cellulose kann hier nicht als Gegenbeweis gelten.

großer Quantität eintrat, darauf beziehen konnte. Auch binden die Kohlenhydrate diese Stoffe nicht.

Versuch 8.

1 g Blutalbumin wurde fein zerrieben und mit 10 ccm n-Ammoniaklösung vermischt. Nach 3 Stunden ergab die titrimetrische Untersuchung der filtrierten Flüssigkeit, daß nur noch 7,8 ccm n-Schwefelsäure zur Neutralisation nötig waren. Es waren also $2{,}2 \times 0{,}017 = 0{,}0374$ g Ammoniak aus der Lösung verschwunden. Das macht 3,74 % des angewandten Eiweißstoffes.

Die Bindung der Base ist also bei weitem nicht so ausgiebig wie bei der Diastase.

Versuch 8a.

1 g Pepton wurde in Wasser aufgelöst (stark alkalisch). Nach 2 Stunden von der Zeit an gerechnet, wo der Zusatz von 10 ccm n-Ammoniak erfolgt war, wurde die Flüssigkeit mit n-Schwefelsäure titriert. 10 ccm n-Schwefelsäure waren nötig, bis die Neutralisation, erkennbar an dem Farbenumschlag des zugesetzten Lackmus, eintrat.

Also war gar kein Ammoniak gebunden. Der Ammoniakgeruch war auch noch gleich stark wie anfangs.

Versuch 9.

1 g Muskeleiweiß, eines feinen gelblich-weißen Pulvers, in welchem mikroskopisch noch Stücke von quergestreiften Muskelfasern nachweisbar waren, wurde mit 10 ccm n-Ammoniak 3 Stunden lang stehen gelassen. Die Titration der filtrierten Flüssigkeit ergab dann, daß nur 8,5 ccm n-Schwefelsäure zur Neutralisation nötig waren.

Also waren $1{,}5 \times 0{,}017 = 0{,}0255$ g NH_3 gebunden worden. Das macht 2,55 % des angewandten Muskeleiweißes.

Versuch 10.

1 g Hühnereiweiß wurde in fein zerriebenem Zustande mit 10 ccm n-Ammoniak vermischt und 3 Stunden lang stehen gelassen.

Die Titration ergab dann nach dem Filtrieren 7,5 ccm

n-Schwefelsäureverbrauch bis zum Eintritt der neutralen Reaktion.

Somit waren $2,5 \times 0,017 = 0,0425$ g NH_3 gebunden worden. Das macht 4,25 % von dem Gewichte des angewandten Eiweißstoffes.

Versuch 11.

1 g Casein, das als feines weißes Pulver bezogen worden war, wurde mit 10 ccm n-Ammoniak 3 Stunden stehen gelassen.

Die Titration der nun filtrierten Flüssigkeit ergab 7,7 ccm n-Schwefelsäureverbrauch.

Somit waren $2,3 \times 0,017 = 0,039$ g NH_3 durch das Casein gebunden worden. Das macht 3,9 % von dem Gewichte des angewandten Caseinstoffes.

Nun erfolgte noch eine Prüfung von Stärke, also eines Kohlenhydrates, auf Ammoniakbindungsvermögen, um den Vergleich gegen die Eiweißstoffe zu haben.

Versuch 12 (Vergleichsversuch).

1 g Stärke wurde ebenso behandelt wie bei den Eiweißstoffen angegeben. Binnen 3 Stunden ergab sich eine Bindung von $0,5 \times 0,017 = 0,0086$ g NH_3, d. i. 0,85 % von der angewandten Stärke.

Daß hier überhaupt eine Bindung erfolgte, liegt vielleicht zum Teil an beigemengten Eiweißstoffen, die sich ja bei der Gewinnung der Stärke durch Ausschlämmen aus den Zellen leicht beimischen können.

Möglicherweise handelt es sich hier auch um eine nur physikalische Bindung der Base.

Ich habe leider versäumt, die Probe hierauf zu machen.

Überblicken wir die mit den Eiweißstoffen erhaltenen Resultate bezüglich des Ammoniakbindungsvermögens, so ergibt sich eine durchweg geringere Bindung als bei Diastase.

Es ergab sich für Blutalbumin, Pepton, Muskeleiweiß, Hühnereiweiß, Casein der Reihe nach 3,74, 0,00, 2,55, 4,25, 3,9 % Ammoniakbindung, berechnet auf den lufttrockenen Eiweißstoff.

Diesen Zahlen stehen 10,2 % Ammoniakbindung bei dem Diastasepulver gegenüber.

Woher dieser große Unterschied?

Wenn die Diastase ein Eiweißstoff ist — und darauf weisen doch wohl viele Erscheinungen hin —, dann ist es wohl naturgemäß an das Protoplasmaeiweiß zu denken. Denn aus dem Protoplasma stammen die Enzyme. Sie sind vielleicht Trümmer des hochmolekularen Plasmaeiweißes.

Wie verhält sich nun dieses gegen Ammoniak?

Ich habe das an Hefe geprüft.

Wenn man 1%ige Ammoniaklösung auf (Preß-) Hefe einwirken läßt, so ergibt sich eine deutliche Bindung des Ammoniaks, indem der Ammoniakgehalt der Lösung abnimmt.

Wendet man viel Preßhefe und relativ wenig Ammoniaklösung an, so kann man erreichen, daß der Ammoniakgeruch fast völlig verschwindet.

Es entsteht durch die Bindung „Ammoniakhefe", die nach dem Wegwaschen der anhängenden Lösung völlig geruchlos ist.

Etwas Ammoniak bleibt natürlich immer noch in Lösung, da die Reaktionsfähigkeit zwischen Hefeeiweiß und Ammoniak ihre Grenze hat.

Diese Grenze liegt bei lebender Hefe allerdings recht tief, denn 0,017%ige Ammoniaklösung wird noch gebunden.

Tote Hefe freilich bindet bei dieser Verdünnung nicht mehr.

Mit dieser letzteren hat man zu rechnen, wenn Hefe mit 1%iger Ammoniaklösung behandelt wird.

Dieselbe stirbt sofort ab.

Die entstandene Ammoniakhefe kann nach genügendem Auswaschen direkt nicht als ammoniakalisch erkannt werden, weder durch den Geruch noch durch die Lackmusreaktion.

Hingegen ergibt sich Ammoniakgeruch beim Kochen mit Kalkwasser oder mit Kalilauge.

Ferner verursachen die Dämpfe braune Flecke auf Curcumapapier, braune Flecke auf Manganvitriolpapier, blaue Flecke auf Kupfervitriolpapier.

Also wird durch Kochen mit fixen Alkalien aus der Ammoniakhefe Ammoniak abgespalten werden, ähnlich wie aus irgendeinem Ammoniaksalz.

Was die Menge des gebundenen Ammoniaks anlangt, so habe ich schon vor einiger Zeit[1]) festgestellt, daß 20 g Preß-

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 156.

hefe binnen 24 Stunden ca. 1 g Ammoniak aus 100 ccm einer 1,7 %igen Ammoniaklösung zu binden vermögen.

Das macht 5 g Ammoniak auf 100 g Preßhefe und ca. 15 g Ammoniak auf 100 g Trockenhefe, also 15 % berechnet auf Hefetrockensubstanz.

Damit haben wir gefunden, daß die starke Ammoniakbindung wie bei Diastase auch beim Protoplasmaeiweiß, ja noch in gesteigertem Maße, angetroffen wird.

Es ist, als ob bei gewöhnlichem Präparateneiweiß nicht mehr so viele basenbindende Gruppen, die Säuregruppen, vorhanden wären.

Weitere Versuche über die Bindung von Basen durch Hefe wurden auch noch mit Natriumhydroxyd angestellt.

Einer davon sei erwähnt.

Daß auch diese Base von der Hefe gebunden wird, nahm ich von vornherein an.

Der Versuch bestätigte das.

Es wurden 20 g Preßhefe mit 100 ccm n-Natronlauge = 40 g NaOH auf 1000 g Lösung, d. i. 4 %) in einer Reibschale gut zerrieben, dann 24 Stunden lang stehen gelassen.

Die Hefe gab schon beim ersten Zusammenreiben einen üblen Geruch von sich, obwohl sie ganz frisch war.

Ihr Eiweiß war offenbar durch die 4 %ige Natronlauge etwas angegriffen worden; übelriechende Spaltungsprodukte (Schwefelwasserstoff, Aminbasen usw.) waren entstanden.

Nach 24 Stunden roch die Flüssigkeit unangenehm nach alten Seefischen.

Es waren also durch die Einwirkung der Natronlauge Amine von flüchtiger Beschaffenheit gebildet worden.

Die Natronlauge, die 24 Stunden mit der Hefe in Berührung gewesen war, verbrauchte pro 10 ccm nur 6,1 ccm n-Schwefelsäure. Das macht pro 100 ccm Lauge 61 ccm n-Schwefelsäure.

Es waren 39 ccm n-Natron verschwunden.

Das macht $39 \times 0{,}04 = 1{,}36$ g Natron; sie waren gebunden worden durch die Einwirkung von 20 g Preßhefe auf 100 ccm n-Natronlauge (binnen 24 Stunden).

Würden keine Aminbasen entstanden sein, so wäre die Abnahme noch etwas größer gewesen.

Auch ein dem Ammoniak verwandter Stoff, das Hydrazin, wurde in demselben Sinne geprüft.

Dasselbe reagiert nicht bloß mit Säuregruppen, sondern auch mit Aldehydgruppen, so daß die Art der Bindung hier zweifelhaft bleibt.

Hydrazin(hydrat) $NH_2.NH_2 + H_2O$.

Dieser merkwürdige Stoff, auch Diamid genannt, lag mir als 50%ige Lösung in einem luftdicht verschlossenen Fläschchen vor.

Durch Verdünnen mit Wasser stellte ich daraus zunächst eine n-Lösung her, die zu meiner n-Säure stimmte.

Die n-Lösung wurde dann teilweise zu $^n/_{10}$-Lösung verdünnt.

Zum Teil wurde sie in $^n/_{100}$-Lösung verwandelt.

Die Versuche wurden in derselben Weise angestellt wie die vorausgehenden.

Die Titration ergab, daß

aus 100 ccm einer 5%igen Hydrazinhydratlösung binnen 24 Stunden durch 20 g Hefe 0,5 g Hydrazinhydrat,

aus 1000 ccm einer $0,5\%$igen Hydrazinhydratlösung binnen 24 Stunden durch 20 g Hefe 0,28 g Hydrazinhydrat,

aus 1000 ccm einer $0,05\%$igen Hydrazinhydratlösung binnen 24 Stunden durch 20 g Hefe 0,1 g Hydrazinhydrat

gebunden werden.

Die mit der Verdünnung geringer werdende Menge erklärt sich aus dem Absitzen der Hefe, das eine mangelhafte Berührung der Hefe mit dem Hydrazinhydrat zur Folge hatte.

Mit dem Ammoniak verglichen, zeigt das Hydrazin ein geringeres quantitatives Bindungsvermögen; denn

20 g Hefe binden im höchsten Falle 1 g NH_3,
20 g " " " " " 0,5 g $NH_2.NH_2 + H_2O$.

Vermutlich ist hier außer der Säurebindung noch eine andere stark mit im Spiele (Aldehydgruppenbindung), die quantitativ weniger ausgiebig ist; das Hydrazin wird von den

Säuregruppen des Proteins nicht so reichlich gebunden wie Ammoniak.

Berechnet man die Bindung der genannten Basen auf Gramme Hefetrockengewicht (33 %₀ der Preßhefe) und zugleich auf Prozente, so ergibt sich:

Das Ammoniak wird zu 15 %, das Ätznatron zu 20,40 %, das Hydrazin zu 1,5 bis 7,5 % (je nach der Stärke der Hydrazinlösung) gebunden.

Dabei besitzt das Ammoniak das Äquivalentgewicht 17, Natriumhydroxyd 40, Hydrazinhydrat 50.

Die gebundenen äquivalenten Mengen verhalten sich also wie 0,88 : 0,57 : 0,03 bis 0,15.

Was die Bindung von Säuren anlangt, so wurde schon erwähnt, daß die Diastase keine n-Schwefelsäure (= 4,9 %) zu binden vermag.

Wie verhalten sich nun gewöhnliche Eiweißstoffe dazu?

Versuch 13.

1 g Hühnereiweiß wurde mit 10 ccm n-Schwefelsäure gemischt.

Nach 24stündigem Stehen ergab die Titration der filtrierten und gut nachgewaschenen Flüssigkeit, daß 8,3 ccm n-Ammoniak zur Neutralisation nötig waren.

Somit waren $1{,}3 \times 0{,}049 = 0{,}0637$ g Schwefelsäure gebunden worden.

Das macht 6,37 % Schwefelsäure, die von dem Hühnereiweiß gebunden wurde.

Das Eiweiß war zum Teil nur gequollen, zum Teil gelöst. Die kolloidale Lösung war trüb.

Versuch 14.

1 g Pepton wurde mit 10 ccm n-Schwefelsäure gemischt. Es löste sich vollständig auf.

Die Titration der Flüssigkeit ergab nach 24 Stunden, daß 10 ccm n-Ammoniak zur Neutralisation nötig waren.

Somit war keine Schwefelsäure gebunden worden.

Oder dieselbe war gebunden und wurde bei Zugabe des n-Ammoniaks wieder aus ihrem Verbande mit dem Pepton losgerissen. Das Pepton reagierte stark alkalisch. Doch ist

eine glatte und momentane Spaltung durch nur 4,9 %ige kalte Schwefelsäure nicht wahrscheinlich.

Versuch 15.

1 g Muskeleiweiß wurde mit 10 ccm n-Schwefelsäure gemischt.

Nach 24 Stunden ergab die Titration, daß 9,00 ccm n-Ammoniak zur Neutralisation nötig waren.

Somit waren 1 × 0,049 = 0,049 g Schwefelsäure gebunden worden.

Daraus berechnet sich 4,9 % Schwefelsäurebindung.

Die Bindung der Säure durch die genannten Proteinstoffe beträgt also 6,37 % (bei Hühnereiweiß), 0,0 % (bei Pepton), 4,9 % (bei Muskeleiweiß).

Dabei ist aber zu beachten, daß beim Pepton eine Wiederabspaltung der Verbindung während des Titrierens eintreten konnte, da dasselbe sich vollständig in der Lösung befand, und daß hiermit das negative Resultat vielleicht nur scheinbar ist.

Da aber das Pepton selbst kräftige alkalische Reaktion auf Lackmuspapier zeigte, so ist ein solcher Sachverhalt ganz unwahrscheinlich; denn das frei gewordene Pepton würde den Umschlag zu blau bewirken.

Die gebundene Säuremenge bei den Versuchen mit Hühnereiweiß und Muskeleiweiß steht weit zurück hinter der, die man bei Versuchen mit Hefe und Schwefelsäure gebunden findet zurück.

Wie schon erwähnt, erhält man dort eine Bindung von gegen 13 % (berechnet auf trockene Hefe), wenn man Schwefelsäure von 4,9 %, d. i. n-Schwefelsäure, auf Preßhefe einwirken läßt.

Dagegen bindet Diastase 0,00 % Schwefelsäure aus n-Schwefelsäurelösung.

Um dieses merkwürdige Resultat sicherzustellen, machte ich zunächst noch Versuche mit n-Schwefelsäure und Diastase bei gesteigerter Temperatur, dann auch noch Versuche mit Diastase und anderen Säuren.

Versuch 16.

1 g Diastase wurde mit 10 ccm n-Schwefelsäure 1 Stunde lang auf dem Wasserbad erwärmt.

Die Titration ergab dann keine nennenswerte Schwefelsäurebindung.

Also hatte auch Erwärmung jene Bindung nicht herbeizuführen vermocht.

Versuch 17.

1 g Diastase wurde mit 10 ccm n-Salzsäure 24 Stunden lang im bedeckten Glase stehen gelassen.

Als nun filtriert und das Filtrat auf titrimetrischem Wege geprüft wurde, ergab sich, daß keine Salzsäure gebunden worden war.

Wir dürfen also wohl annehmen, daß die Diastase Säure überhaupt nicht zu binden vermag und somit keine basischen Gruppen, oder schon abgesättigte, in ihrem Molekül enthält.

Versuch 18.

1 g Takadiastase wurde mit 10 ccm n-Ammoniak 24 Stunden stehen gelassen. Sie hatte von Anfang an eine deutliche alkalische Reaktion.

Die Titration ergab nun, daß eine 2,2 ccm n-Ammoniak entsprechende NH_3-Menge verschwunden war, also 0,0374 g.

Die Takadiastase vermag also 3,74 % ihres Gewichtes Ammoniak zu binden, somit wesentlich weniger als meine Diastase aus Malz (letztere 10,2 %).

Nach der stärkeren Rotfärbung der Lösung zu schließen, war wesentlich mehr Takadiastase in Lösung gegangen. Vielleicht ist auf dieses Verhalten (neben größerer Verunreinigung mit Kohlenhydraten) die geringere Ammoniakbindung zu schieben.

Denn die gelöste Diastase bindet zwar vermutlich auch Ammoniak, das in der Lösung gebundene Ammoniak kommt aber bei der Titration vielleicht nicht als Verlust zum Vorschein, weil es durch den Säurezusatz wieder abgespalten und mit der Säure verbunden wird, die freie Diastase aber nur schwach auf Lackmus wirkt.

Anders verhält es sich mit dem nun zu beschreibenden negativen Ammoniak-Versuch an Pepsin; denn dieses reagiert deutlich sauer, so daß bei eventueller Spaltung der erwarteten Ammoniakpepsinverbindung durch das freiwerdende Pepsin eine saure Reaktion in der sonst durch n-Schwefelsäurezusatz

schon abgesättigten Lösung eintreten muß. Das Resultat ist also so zu nehmen, wie es sich darbietet.

Pepsin.

Versuch 19.

1 g Pepsin wurde mit 10 ccm n-Ammoniak 24 Stunden stehen gelassen (im bedeckten Glase). Es löste sich völlig auf.

Die Titration ergab keinen nennenswerten Ammoniakverlust.

Also war kein Ammoniak durch Pepsin gebunden worden.

Ein ähnlicher Versuch mit 1 g Pepsin und 10 ccm n-Schwefelsäure ergab keine Abnahme des Säurewertes der Flüssigkeit.

Da auch hier völlige Lösung des Enzyms eintritt (im Gegensatz zu anderen Enzymen, wo die Auflösung in der n-Schwefelsäure meist unterbleibt oder nur sehr wenig eintritt) und das Pepsin eine saure Reaktion hat, so könnte hier ein nur scheinbares Resultat vorliegen. Denn das saure abgespaltene Pepsin würde die Probeflüssigkeit neutralisieren.

Doch glaube ich nicht daran, wegen der nach meinen Erfahrungen ziemlich festen Bindung, wenn die Vereinigung zwischen Enzym und n-Säure einmal erfolgt ist. Man kann auch durch wiederholtes Eintauchen von Lackmuspapier während des Zusatzes von Pepsinpulver zu n-Schwefelsäure keine Abnahme der Rotfärbung erkennen.

Über die chemische Natur des Pepsins geben meine Versuche wenig Aufschluß.

In der Literatur findet man zunächst immer die Klage, daß kein reines Präparat bis jetzt hergestellt wurde.

In Oppenheimers Fermente, S. 91, heißt es: „Das Ferment zu isolieren gelang Schwann nicht; es ist auch bis jetzt nicht gelungen, das Pepsin als chemisch reinen Körper zu isolieren, so daß man seine Eigenschaften nur an annähernd reinen Präparaten studieren kann.“

Schwann[1]) selbst hat durch Ausfällen mit Quecksilberchlorid und Zerlegen des Niederschlages ein pepsinhaltiges Präparat gewonnen.

---

[1]) Ein nachträglich angestellter Versuch mit Pepsin und Salzsäure ergab ebenfalls keine Bindung der Säure.

Wasmann erzielte durch ein ähnliches Verfahren und Fällung des Filtrates mit Alkohol ein festes wirksames Präparat.

Durch Ausfällen (Niederreißen) mit frisch gefälltem phosphorsaurem Kalk, Wiederauflösen, Ausfällen mit Cholesterin und Auflösen des Cholesterins in Äther erzielte Brücke eine Pepsinlösung.

Später benützte v. Wittich[1]) die Eigenschaften der meisten Enzyme, in Glycerin löslich zu sein, zur Darstellung von Pepsinlösungen, aus denen er das Pepsin durch Alkohol fällen konnte. Zur Reinigung bediente er sich der Dialyse (unter Thymolzusatz).

Ähnlich wie Brücke durch Ausfällen mit phosphorsaurem Kalk suchte Maly das Pepsin zu isolieren unter nachheriger Anwendung der Dialyse; er erhielt so eine Pepsinlösung.

Auch durch einfaches Abkühlen von Magensaft auf Nullgrad hat man festes Pepsin erhalten (Limanowski).

Durch Dialysieren von frischem Magensaft erhielt Pekelharing einen nucleoproteidähnlichen Körper, der peptisch sehr wirksam sein soll. Er glaubt[2]) an eine Nucleoproteid-Natur des Pepsins.

Aus allem ist zu erkennen, daß Pepsin eine durch Dialysenpapier (Pergamentpapier) nicht hindurchfiltrierende Substanz ist.

Wenn diese Eigenschaft zur Trennung angewendet wird, so muß natürlich eine Verunreinigung mit Eiweißstoffen eintreten, falls solche, wie gewöhnlich, in den Säften vorhanden sind; die letzteren gehen ja ebenfalls nicht durch Dialysenpapier hindurch!

Was die Eiweißnatur des Pepsins selbst anlangt, so wird von Brückes Pepsin berichtet, daß eine Lösung desselben keine Fällung mit den üblichen Eiweißreagenzien, wie Platinchlorid, Quecksilberchlorid, Gerbsäure, dagegen Fällung mit neutralem oder basischem Bleiacetat gibt. Sie gibt eine schwache Xanthoprotein-Reaktion.

Auch Sundberg konnte in seinem Pepsinpräparat keine Eiweißreaktionen mehr auffinden[3]).

Pekelharing wiederum sprach von einem nucleoproteid-

---

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 2, 193; 3, 339.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 1896/97.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 319.

ähnlichen, peptisch sehr wirksamen Körper, der durch Dialysieren frischen Magensaftes erhalten wurde.

Was ferner die Verbindungsfähigkeit mit Säuren betrifft, so gibt v. Wittich[1]) an, daß Pepsin sich mit Salzsäure zu einer sehr lockeren Verbindung vereinigt.

Das ist eine der wenigen Angaben, die ich in der Literatur über die Bindung von Säuren durch Enzyme vorgefunden habe.

Über Basenbindung ist so viel wie gar nichts bekannt.

Meine eigenen Versuche haben, wie oben angegeben wurde, ergeben, daß das Pepsin weder Säuren noch Basen zu binden vermag, wenigstens nicht bei der Normal-Verdünnung (3 bis 5 %).

Bei Anwendung solcher Verdünnungen erhält man bei manchen gewöhnlichen Eiweißstoffen wohl eine Bindung. Fleisch quillt schon in 1 bis 2 %iger Lösung auf und bindet die Säure.

Trypsin.

Auch dieses ist vermutlich noch nicht rein dargestellt.

Trotzdem hat man seine Eiweißnatur vermutet. Kühne hält es für ein noch komplexer gebautes Eiweiß als Diastase, da es beim Erhitzen mit verdünnten Säuren Eiweißstoffe abscheidet.

Es wird als ein in Wasser leicht löslicher Körper beschrieben. In reinem Glycerin und in starkem Alkohol ist es unlöslich, in 40 %igem Alkohol dagegen löslich[2]).

Meine zwei Trypsinpräparate waren beide von Dr. G. Grübler, das eine mehrere Jahre alt[3]), das andere neu (etwa 6 Monate alt).

Beide reagierten neutral.

Das erstere löste sich in Wasser (1 g auf 10 g Wasser) nur wenig auf (also war es nicht leicht löslich), in n-Schwefelsäure löste es sich ebenfalls wenig; in n-Ammoniak auch nur zum Teil (etwa zur Hälfte).

Das letztere löste sich in Wasser (1 g auf 10 g Wasser) ebenfalls nur wenig auf; ferner in n-Schwefelsäure nur zum Teil, es blieb ein starker Satz; in n-Ammoniak löste es sich völlig auf bei Anwendung von 1 g Trypsin auf 10 ccm n-Ammoniak..

---

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 5, 203.

[2]) Dastre, Arch. f. d. ges. Physiol. 1896, 120.

[3]) Es trug die Angabe: 0,1 g gelöst in ca. 20 ccm alkalischem Wasser, verdaut 8 bis 10 g Blutfibrin.

Versuch 20.

1 g Trypsin (alt) wurde mit 10 ccm n-Ammoniaklösung 24 Stunden im bedeckten Glase stehen gelassen.

Als nun filtriert und das Filtrat auf seinen Basengehalt titrimetrisch geprüft wurde, ergab sich ein Verlust von Base.

Es waren 2,2 ccm n-Ammoniak, d. i. 0,0374 g NH_3, gebunden worden. Das macht 3,74 % NH_3, auf Trypsintrockengewicht ausgerechnet.

Ein ähnlicher Versuch mit frischem Trypsin verunglückte.

Versuch 21.

1 g Trypsin (alt) wurde mit 10 ccm n-Schwefelsäure 24 Stunden stehen gelassen. Das Pulver löste sich wenig auf.

Als nun filtriert und das Filtrat untersucht wurde, ergab sich ein Schwefelsäureverlust von 1,2 ccm n-Schwefelsäure gleich 0,0588 g, d. i. 5,88 % Schwefelsäurebindung, auf lufttrockenes Trypsin berechnet.

Die Reaktion meiner beiden Trypsinpräparate gegen Lackmuspapier war neutral.

Versuch 22.

1 g Trypsin (frisch) wurde mit 10 ccm n-Ammoniak 24 Stunden stehen gelassen (im bedeckten Glase). Es erfolgte vollkommene Lösung.

Die Titration ergab dann, daß 2,0 ccm n-Ammoniak weniger da waren, nämlich einen n-Schwefelsäureverbrauch von 8,0 ccm bis zur Umfärbung des Lackmus in Rot.

Es waren also 0,034 g Ammoniak, d. i. 3,4 % NH_3, durch das Trypsin gebunden worden.

Versuch 23.

1 g Trypsin (frisch) wurde mit 10 ccm n-Schwefelsäure vermischt und 20 Stunden lang stehen gelassen. Das Pulver blieb größtenteils ungelöst.

Nach 20 Stunden ergab nun die Titration, daß nur 0,4 ccm n-Schwefelsäure nicht mehr nachweisbar waren.

Es waren also 0,0196 g, d. i. 1,96 %, Schwefelsäure durch das Trypsin gebunden worden.

Von Schwefelsäure vermag mein frisches Trypsin nur wenig (1,96 % seines Trockengewichtes), das alte dagegen beträchtlich mehr (5,88 %) zu binden.

Worauf beruht dieser Unterschied?

Vielleicht auf einen verschiedenem Gehalt an Eiweißbeimengungen?

Nach Angaben früherer Forscher scheint das Trypsin eine den Eiweißkörpern nahestehende, sehr komplizierte Zusammensetzung zu haben.

Nach Kühne soll es sogar noch komplexer gebaut sein, da es erst bei der Spaltung Eiweißstoffe abscheidet, wenn man es mit verdünnten Säuren erhitzt.

Eine Beimischung von Eiweißstoffen als Verunreinigung ist freilich gar nicht unwahrscheinlich infolge des Vorkommens und der Darstellungsmethode.

Pankreassaft wurde ursprünglich mit Alkohol gefällt, es entstand ein trypsinhaltiger Niederschlag.

Er wurde Pankreatin genannt.

Derselbe enthält eine Beimengung von Eiweißstoffen, die Kühne unter dem Namen Leukoid zusammenfaßte, ferner noch andere Verunreinigungen, von denen er das Präparat durch Auflösen in Wasser von 0°, sukzessive fraktionierte Fällung mit Essigsäure und Soda, schließlich durch Dialyse größtenteils befreien konnte.

Eine völlige Befreiung vom Eiweiß bedeutet das wohl kaum.

Eine andere Methode zur Darstellung des Trypsins ist folgende:

Hammarsten extrahierte die Bauchspeicheldrüse mit 0,03% Ammoniak und fällte mit Essigsäure. Der Niederschlag wurde dann mit Sodalösung aufgelöst. Auch hier ist Eiweißbeimengung wahrscheinlich.

Hulewitsch extrahierte die Pankreasdrüse mit chloroform- und thymolhaltiger Sodalösung. Eiweißbeimengung wahrscheinlich.

O. Loew[1]) extrahierte mit 40%igem Alkohol und fällte mit Alkoholäther. Auch hiermit erhält man vermutlich kein reines Enzym.

Wir haben hier mit derselben Schwierigkeit wie bei allen andern Enzymen zu kämpfen, der Unmöglichkeit, ein reines Enzym herzustellen.

---

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 27, 207.

Schon das Chaos von chemischen Stoffen, von dem man auszugehen hat, wenn man Trypsin und andere Enzyme aus tierischen Organen, aus Pflanzen, aus Pilzen herzustellen wünscht, erschwert die Arbeit.

Dazu kommt die Fähigkeit der großmolekularen Eiweißstoffe, andere Stoffe bei Ausfällungen mit niederzureißen, wie schon eingangs erwähnt wurde.

Endlich ist der Reinigungsprozeß, wenn man einen solchen versucht, meist für das Enzym gefährlich, indem die Auflösungs- und Fällungsmittel oft Enzymgifte sind.

Ferner wird das Enzym um so empfindlicher, je mehr es von seiner natürlichen Umgebung losgelöst, also gereinigt wird.

Lab.

Mein Präparat von Dr. G. Grübler & Co. war als wirksam 1:300000 bezeichnet; es war ein weißgelbliches Pulver, etwas sauer reagierend.

1 g davon wurde abgewogen und zunächst mit 8 ccm aq. dest. übergossen und geschüttelt. Nach 12 Stunden war nur ein Teil davon gelöst (etwa die Hälfte). Die Reaktion dieser Lösung war gegen Lackmuspapier sauer.

Bei Zusatz von 10 ccm n-Ammoniak löste es sich noch weiter auf, so daß nur noch ein geringer Bodensatz übrigblieb.

Versuch 24.

1 g Labpulver wurde mit 10 ccm n-Ammoniak 24 Stunden im geschlossenen Glase stehen gelassen. Es löste sich auf.

Die Prüfung ergab dann einen Ammoniakverlust von 2 ccm n-NH_3, d. i. 0,034 g, oder 3,4% Ammoniakbindung auf trocknes Lab berechnet.

Versuch 25.

1 g Labpulver wurde mit 10 ccm n-Schwefelsäure übergossen und 24 Stunden lang stehen gelassen. Lösung trat nur teilweise ein.

Es ergab sich, daß im Filtrat nun 0,6 ccm n-H_2SO_4 fehlten.

Also war 0,0294 g Schwefelsäure verschwunden.

Die Schwefelsäurebindung betrug also **2,94%** vom Gewicht des angewandten lufttrocknen Enzyms.

Da bei n-Ammoniak eine völlige Lösung des Enzyms eintrat, so mußte die Verbindung zwischen Ammoniak und

Enzym in der Lösung enthalten sein. Trotzdem war eine Abnahme des Säurewertes dieser Flüssigkeit zu erkennen.

Entweder wurde die Verbindung durch den Säurezusatz nicht gespalten oder das freiwerdende Enzym hatte saure Wirkung auf Lackmus (stimmt).

Da, wie schon früher erwähnt, die Bindung zwischen Base (oder Säure) und Enzym ziemlich fest zu sein pflegt, so daß sie meist nur mit kräftigen Reagenzien und bei ziemlich hoher Temperatur aufgehoben werden kann, so ist die erstere Annahme wahrscheinlich, nämlich daß die Enzym-Ammoniakverbindung durch n-Schwefelsäure nicht gespalten wird.

Die obenerwähnte saure Reaktion des auf Lackmuspapier gelegten und befeuchteten Labpulvers mag wohl z. T. auf einer Beimengung beruhen, die wegen zu geringer Menge keinen Einfluß haben konnte.

Diese Beimengung war jedenfalls an der Ammoniakbindung nur in ganz geringem Maße beteiligt.

Meine Beobachtungen weisen also auch auf eine Eiweißnatur des Labfermentes hin, wie sie schon durch andere Untersuchungen wahrscheinlich gemacht worden ist.

Durch meine Feststellungen ist der amphotere Charakter des Labenzyms erwiesen, der wohl bei Eiweißstoffen ziemlich allgemein auftritt.

Von sonstigen Beobachtungen sei angeführt, daß Magensaft das Kälberlab nach Hammarsten bei 24 bis 48 stündiger Digestion zerstört. Vermutlich wird es durch den Magensaft verdaut und damit verändert.

Bezüglich der rein chemischen Eiweißerkennung wird angegeben, daß die Fällbarkeit mit Bleiacetat vorhanden ist. Doch soll es nach Mayer[1]) auch durch andere Schwermetallsalze gefällt werden.

Ammonsulfat von 80 bis 100 $^0/_0$ iger Sättigung fällt die Lablösung.

Die Lösung in Wasser ist eine kolloidale.

Somit haben wir eine ganze Reihe von Erscheinungen, die für die Eiweißnatur sprechen.

Das Labferment ist sehr häufig mit Pepsin vergesellschaftet innerhalb der tierischen Organe und Säfte.

[1]) Landw. Vers.-St. 27, 247.

Das hat zu der Meinung geführt, daß Lab und Pepsin identisch seien oder richtiger gesagt, daß die Pepsinwirkung und die Labwirkung durch ein und dasselbe Enzymmolekül hervorgerufen werden, in welchem eine Seitenkette der Lab- und eine der Pepsinwirkung zukommen.

Hierüber sollen später noch einige Worte angefügt werden.

Emulsin.

Mein Präparat (von Kahlbaum-Berlin) war einige Jahre alt und stellte kleine grauviolett durchschimmernde Körnchen von spröder Beschaffenheit dar.

Es war in Wasser ziemlich schwer löslich.

In n-Ammoniak schien es ziemlich löslich zu sein, mit bräunlicher Farbe; Rückstand schleimig.

In n-Schwefelsäure war es unlöslich.

Reaktion gegen Lackmus etwas sauer.

Versuch 26.

1 g Emulsin wurde pulverisiert und mit 10 ccm n-Ammoniak 24 Stunden stehen gelassen. Es trat teilweise Lösung ein, die Flüssigkeit hatte rotbraune Farbe.

Die Titration des Filtrates ergab dann, daß 2,5 ccm n-Ammoniak verschwunden waren.

Das entspricht einer Bindung von 4,25 $^0/_0$ Ammoniak (auf lufttrocknes Emulsin gerechnet).

In dem Augenblick, wo die Farbe der mit Lackmus versetzten Flüssigkeit von Blau in Rot umschlug, trat ein bleibender grauweißlicher Niederschlag ein, es war also Substanz (Enzym) gelöst, mit dem Eintritt der sauren Reaktion der Flüssigkeit schwand die Löslichkeit dieser Substanz. Schon zuvor war dieser Niederschlag zu bemerken; er verschwand aber beim Umschütteln, solange die Lösung noch blau war.

Versuch 27.

1 g Emulsin, pulverisiert, wurde 20 Stunden mit 10 ccm n-Schwefelsäure stehen gelassen.

Das Pulver hatte sich nicht gelöst.

Die Titration des Filtrates ergab eine Abnahme des Säuregehaltes.

Es waren durch 1 g Emulsin 1,9 ccm n-Schwefelsäure ge-

bunden worden, das macht 7,35 % Schwefelsäurebindung, auf lufttrocknes Labpulver ausgerechnet.

Zusammenfassung.

Bei meinen bisherigen Versuchen hat von den geprüften Enzymen nur eines ein total negatives Resultat ergeben, nämlich das Pepsin, das weder Säuren noch Basen bindet; eines ferner ein teilweise negatives Resultat, nämlich die Diastase, die nur Basen aber keine Säuren bindet.

Das Pepsin verhält sich total anders wie das Labferment.

Somit findet die Anschauung, daß sie identisch seien, in meinen Versuchen keine Stütze.

Die meist vorhandene Fähigkeit der Enzyme, sowohl Säuren als Basen zu binden, spricht für die vielbehauptete Eiweißnatur derselben.

Wenn die Bindung unterbleibt, wie beim Pepsin, so wage ich das nicht als Beweis gegen die Eiweißnatur anzuführen.

Es gibt ja auch zweifellos zur Gruppe der Proteinstoffe gehörige Substanzen, wie das Fleischpepton, die nicht binden.

Nicht unwahrscheinlich ist es, daß die Größe des Moleküles hier etwas ausmacht.

Es war leider nicht möglich, alle bekannteren Enzyme in den Bereich der Untersuchung zu ziehen, geschweige denn die selteneren.

Meine Versuche hätten sich auch noch auf eine Reihe von anderen Stoffen als Säuren und Alkalien erstrecken sollen. Doch sind die hierfür erforderlichen Mengen Enzym zu teuer zu beschaffen.

Vielleicht wird später eine Fortführung der Versuche möglich sein.

Allgemeine Bemerkungen.

Es handelt sich in diesem Aufsatz um die stoffliche Natur der in ihren Wirkungen so eigenartigen Enzyme. Ein kleiner Beitrag zu diesem Kapitel soll mit diesen Zeilen geliefert werden.

Zunächst sei erwähnt, was in dieser Beziehung sonst bekannt geworden ist.

„Was man mit Sicherheit für die meisten Enzyme angeben kann, ist die kolloidale Natur derselben," sagt Oppenheimer[1]).

---

[1]) Fermente Bd. I, S. 28.

Tabellarische Zusammenstellung einiger meiner Resultate.

Name des Enzyms (bzw. Eiweißstoffes)	Eigenschaften	Bemerkungen
Diastase (Pulver)	Gelblichgraues Pulver, fast unlöslich in Wasser in Normal-(1,7%)-Ammoniak oder n-Natronlauge nur wenig löslich (die Flüssigkeit wird gelb bis rot). In dem ungelösten Teil findet sich bei der Behandlung der Diastase mit n-Ammoniak oder n-Lauge eine nicht unerhebliche Menge der Base gebunden vor, bis zu 0,1 g NH_3 bzw. 0,17 g NaOH pro 1 g Diastase, d. i. 10% NH_3 bzw. 1,7% NaOH.	Hefezellen binden aus n-Ammoniak 15% NH_3, aus n-Natron über 20% NaOH (berechnet auf Hefetrockensubstanz).
	In n-Schwefelsäure (4,9%) löst sich die Diastase ebenfalls nicht auf. Eine Bindung der Säure konnte nicht festgestellt werden.	Hefezellen binden bei gleicher Behandlung gegen 13% Schwefelsäure (berechnet auf Hefetrockensubstanz).
	Die Bindung der Basen in dem Diastasepulver ist so fest, daß die Ammoniakdiastase geruchlos ist, nicht alkalisch reagiert, und erst beim Kochen der noch schleimigen, in Wasser aufgeschwemmten Masse mit gelöschtem Kalk oder mit Kalilauge Ammoniak entweichen läßt.	
	Die Diastase wird durch Pepsin unter etwas Salzsäurezusatz anscheinend verdaut. Sie gibt beim Erhitzen Geruch nach verbranntem Horn. Methylviolett wird davon in starkem Maße absorbiert.	Reaktion des Pulvers gegen Lackmuspapier kaum merklich alkalisch.
Blutalbumin (hornige Masse in spröden Blättchen)	absorbiert 3,74% NH_3 (berechnet auf Tr. S. des Eiweißstoffes); ferner 6,37% Schwefelsäure.	Reaktion des Pulvers auf Lackmuspapier deutlich alkalisch.
Muskeleiweiß (feines Pulver)	bindet 2,55% NH_3 von seinem Trockengewicht; " 4,9% H_2SO_4 " " "	Reaktion schwach sauer.
Hühnereiweiß (hornige, aber spröde Masse)	bindet 4,25% seines Trockengewichtes an Ammoniak; bindet 6,37% seines Trockengewichtes an Schwefelsäure.	Reaktion des befeuchteten Pulvers gegen Lackmuspapier schwach alkalisch.
Casein (feines, weißes Pulver)	bindet 3,9% seines Trockengewichtes an Ammoniak; ferner 10,78% Schwefelsäure.	Reaktion des Pulvers auf Lackmuspapier ganz schwach sauer.
Takadiastase	vermochte 3,74% ihres Gewichtes Ammoniak zu binden.	Reaktion des Pulvers gegen Lackmuspapier schwach alkalisch.
Pepsin (Pulver von gelblicher Farbe)	löst sich ganz auf, in Wasser wie auch in n-Ammoniak. Bindung von Basen und Säuren nicht nachweisbar; von Säuren wurden n-Schwefelsäure und n-Salzsäure mit negativem Erfolge geprüft, von Basen n-Ammoniak.	Reaktion gegen Lackmus deutlich sauer. Geschmack deutlich bitter, dabei aber auch süß.
Trypsin, alt (Pulver)	vermochte 3,74% Ammoniak und 5,88% Schwefelsäure zu binden.	Reaktion gegen Lackmus neutral. Mein Präparat war ziemlich schwer löslich in Wasser und in n-Schwefelsäure, leichter in n-Ammoniak.

Name des Enzyms (bzw. Eiweißstoffes)	Eigenschaften	Bemerkungen
Trypsin, frisch (Pulver)	Erster Versuch über Säure- und Basenbindung verunglückt. Ein nachträglicher Versuch ergab 3,4 % Ammoniakbindung 1,96 % Schwefelsäurebindung.	Reaktion gegen Lackmus neutral. 1 g in 10 ccm Wasser wenig löslich, dito in 10 ccm n-Schwefelsäure, aber ganz leicht in 10 ccm n-NH_3.
Lab (Pulver)	vermochte 3,4 % Ammoniak und 2,94 % Schwefelsäure zu binden, beide aus n-Lösung.	Reaktion gegen Lackmus sauer. 1 g Lab in 10 ccm Wasser teilweise sich lösend, mit 10 ccm n-Ammoniak ganz löslich.
Emulsin, durchschimmernde, grauviolette Stückchen (Kahlbaum, Berlin)	Basen und Säuren werden gebunden. Bei n-Ammoniak war eine Bindung von 4,25 % NH_3 titrimetrisch im Filtrat nachzuweisen; bei n-Schwefelsäure eine Bindung von 7,35 % H_2SO_4.	In Wasser schwer löslich. In n-Ammoniak etwas mit bräunlicher Farbe löslich; der Rückstand schleimig. In n-Schwefelsäure unlöslich. Reaktion gegen Lackmus etwas sauer.

Die meisten Enzyme geben mit Wasser bzw. schwachen Salzlösungen Scheinlösungen, ähnlich wie die Proteide. Es sind Emulsionskolloide.

Auch in Glycerin sind sie oft löslich (d. h. in konzentrierten Glycerinlösungen).

Ferner besitzen die Enzyme meist eine geringe Dialysierbarkeit. Sie ist aber bei den einzelnen verschieden groß.

Nach Fermi und Pernossi geht Pepsin durch Papier de la Rue, nicht aber durch gutes Pergament.

Pflanzliche Peroxydase dialysiert nach Bielecki deutlich durch Pergament. Zusatz von Nitraten steigert die Dialyse.

Durch Kollodiummembranen gehen die Enzyme leichter hindurch, Pepsin freilich nicht, wohl aber Trypsinogen.

Ebenso durch Aminomembran (Lab und Pepsin). Ferner durch Darmmembranen. Nicht aber durch Cellulosehüllen. Schilfschläuche lassen die Enzyme durch, ebenso Lipoidmembranen. Doch scheint Lab durch Lecithinmembranen schwerer zu passieren.

In kolloidreichen Medien dialysieren die Fermente schwerer, weil die Kolloide die Poren verstopfen.

Wohl aber gehen die meisten Enzyme durch Porzellanfilter hindurch (Maltase, Lipase).

Von dem pflanzlichen Labferment gibt Lea an, daß es ebenso wie tierisches durch Kaolinfilter zurückgehalten wird.

Chamberlandkerzen werden von allen Enzymen passiert. Doch ist der Grad sehr verschieden. Bei Neutralität gegen Phenolphthalein ist der Durchtritt sehr reichlich, bei der gegen Methylorange werden sie durch Adsorption an das Filter stark zurückgehalten.

Mit der kolloidalen Natur der Enzyme wird auch die Schüttelinaktivierung in Zusammenhang gebracht, die zuerst von Abderhalden beobachtet wurde, dann von Schmidt-Nielsen und Shakler-Meltzer genau untersucht. Sie fanden, daß z. B. Lab und Pepsin durch einfaches Schütteln inaktiviert werden.

Speichelamylase wird nur in verdünntem Speichel durch Schütteln geschädigt (bis auf etwa $^1/_3$), ebenso Takadiastase ($1\,^0/_0$), aber niemals völlig inaktiviert!

Jeder Einfluß, der die Oberfläche noch stärker beeinflußt, wie Schütteln mit Glasperlen, verstärkt die schädigende Wirkung.

Das sieht aus, als ob die Aktivität der Enzyme mit ihrer Oberflächenentfaltung direkt und prinzipiell zusammenhinge.

Oppenheimer spricht das in seinem Buche „Die Fermente“ Bd. I S. 31 noch aus, indem er sagt:

„Vermutlich handelt es sich dabei um eine erhebliche Verringerung der spezifischen Oberfläche der Kolloide, wie sie wohl auch die Hauptursache der Vernichtung der Fermentwirkung durch Erwärmen (Koagulation) und durch Ausfällen ist.“

Man frägt da aber doch unwillkürlich: Warum sind dann nicht alle Kolloide fermentativ wirksam?

Wenn ich eine Lösung von Hühnereiweiß herstelle, so habe ich damit eine kolloidale Lösung.

Warum wirkt sie nicht enzymatisch?

Ferner ist die Kolloidnatur der Enzyme sehr verschiedengradig, ja manchmal kaum noch vorhanden.

„Es scheinen einige besser untersuchte Enzyme, wie z. B. die Amylase, immer noch eine relative große Dispersität zu besitzen.“

„Übergänge führen ja von den sogenannten krystalloiden zu den kolloiden Stoffen, und die Enzyme stehen danach jedenfalls nicht auf der letzten Stufe wie z. B. die echten Proteine bei den hydrophylen Kolloiden.“

Wenn die Enzymwirkung mit der großen Oberfläche direkt

zusammenhängt, dann müssen die Enzyme um so kräftiger sein, je entschiedener kolloidal ihr Zustand ist; das ist eine weitere Forderung, die man stellen muß, wenn man jene rein physikalische Theorie der Enzymwirkung für richtig hält.

Bis jetzt hat noch niemand einen Beweis hierfür erbracht, daß der Grad der Kolloid-Beschaffenheit einen Einfluß in dieser Richtung äußert.

Was die Schüttelinaktivierung betrifft, so ist dieselbe nach Schmidt-Nielsen eine Adsorptionserscheinung an das Glas, an den Rührer usw. Eine große Menge des Enzyms geht infolge einer Oberflächenwirkung in den Schaum hinein. Bei Zusatz von Saponin, der die Eiweißkörper (inkl. Enzym) von den Oberflächen vertreibt, tritt keine Inaktivierung ein, das Enzym bleibt quantitav in der Lösung erhalten. Auch die Hemmung des Phänomens durch Elektrolyte ist eine Beeinflussung der Oberflächenspannung.

Auch die Fällungsreaktionen weisen bei den meisten Enzymen auf Kolloidnatur hin.

Sie werden durch konzentrierten Alkohol (unvollkommen) ausgefällt. In 40 bis 60%igem aber sind sie zum Teil löslich Emulsin, Peptasen).

Schwermetallsalze fällen sie zumeist aus.

Das stimmt nun alles auch auf Eiweißkörper, die freilich auch Kolloide sind.

Ja, es kann niemals mit Sicherheit gesagt werden, ob die Enzyme selbst ausgefällt werden oder ob sie beim Ausfällen der sie begleitenden Proteine durch Adsorption mitgerissen werden (Oppenheimer).

„Ihre Aussalzbarkeit durch Neutralsalze zeigt ähnliche Verhältnisse wie bei den Eiweißkörpern. So werden sie zum Teil durch Ammonsulfat ausgesalzen (Trypsin erst bei voller Sättigung, Erepsin bei 65%)."

Also immer wieder Hinweise auf die Eiweißnatur der Enzyme.

Auf diese gehen wohl auch meine eigenen Versuche hinaus, durch die gezeigt wurde, daß die angeführten Enzyme sowohl Ammoniumhydroxyd als Schwefelsäure zu binden vermögen.

So bindet das Emulsin (Kahlbaum, Berlin) 4,25% NH_3[1]), 7,35% H_2SO_4.

---

[1]) NH_3 sollte eigentlich in NH_4OH umgerechnet werden, da ja bei Gegenwart von Wasser nicht NH_3 sondern NH_4OH existiert und wohl zweifellos eine Basenbindung vorliegt. Auch NaOH wird gebunden.

Trypsin (von Grübler) bindet 3,74% NH_3 und 5,88% H_2SO_4.

Labferment (Grübler) bindet 3,4% NH_3 und 2,94% H_2SO_4.

Diastase freilich bindet keine Säure, wohl aber bis zu 10% NH_3!

Bei Pepsin konnte ich weder eine Bindung von Säure noch eine solche von Base feststellen.

Die amphotere Beschaffenheit der drei zuerst genannten Enzyme (Emulsin, Trypsin, Lab) weist wiederum auf die Eiweißnatur hin.

Denn die Eiweißkörper sind amphotere Elektrolyte, sowohl schwache Basen wie schwache Säuren.

Die Versuche, die ich mit Blutalbumin, Muskeleiweiß, Hühnereiweiß, Casein anstellte, ergaben faktisch alle zusammen eine Bindungsfähigkeit dieser Eiweißkörper sowohl für Ammoniumhydroxyd als auch für Schwefelsäure.

Diastase freilich zeigte kein Bindungsvermögen für Säure, wohl aber für Basen. Sie scheint mir ein Eiweißkörper von ausgesprochen saurem Charakter, eine Proteinsäure, zu sein.

Der Mangel jeden Bindungsvermögens, für NH_4OH sowohl wie auch für H_2SO_4 beim Pepsin fiel mir sehr auf.

Um Parallelen für meine Befunde zu finden, durchsuchte ich die Enzymliteratur nach Angaben über die Bindung bzw. Adsorption, ferner über die elektrochemische Natur der Enzyme, sowie nach Beobachtungen über die Eiweißnatur.

Diastase

(in der neueren Literatur vielfach Amylase genannt).

Michaelis behandelt in seiner Abhandlung „Adsorptionsanalyse der Fermente“[1]) die Adsorption der Enzyme durch Kaolin und durch Tonerde, sowie durch andere Stoffe. Die genannten sind einsinnig geladene Adsorbenzien, das Kaolin negativ, die Tonerde positiv.

Die Pflanzendiastase wird nach ihm von Tonerde vollkommen adsorbiert, von Kaolin nicht oder nur in saurer Lösung.

Meine Diastase ist vermutlich Malzdiastase gewesen. Denn diese ist am leichtesten zu erhalten und praktisch vom größten Interesse.

---

[1]) Diese Zeitschr. 7, 10, 12, 15.

Meine Takadiastase, vom Aspergillus Oryzae erzeugt und aus Kojihefe stammend, war von Grübler bezogen; sie wies ebenfalls die Fähigkeit auf, Ammoniumhydroxyd zu binden.

Es ist nun interessant, daß meine Diastase ebenfalls nur mit basischen, d. i. elektropositiven Stoffen sich zu verbinden vermochte.

Speichelamylase freilich wird sowohl von Kaolin als von Tonerde absorbiert.

Malzamylase wandert in reiner wässeriger Lösung überwiegend kathodisch, aber gleichzeitig etwas anodisch. Bei saurer Reaktion wandert sie rein kathodisch, bei alkalischer rein anodisch. Sie ist also nach diesen Versuchen amphoter.

Von durchaus einseitiger Bindungsfähigkeit scheint auch die

Invertase

zu sein. Ich hatte leider kein Präparat zur Hand.

Sie wird unter allen Umständen von Tonerde, unter keinen Umständen von Kaolin adsorbiert, hat also den Charakter einer Säure (nach Michaelis).

Trypsin.

Es zeigte bei den Versuchen von Michaelis einen amphoteren Charakter. In reinem Wasser wandert es zur Anode; durch $^1/_2\,^0/_0$ige Essigsäure wird es umgeladen und wandert zur Kathode.

Mein Trypsin ergab sowohl Basen- wie auch Säurebindung.

Somit ist es amphoter.

Die Resultate stimmen also überein.

Nach Hammarsten ist das Trypsin ein Nucleoproteid, was ja auch von vielen anderen Enzymen schon behauptet worden ist.

Unter Trypsin ist hier wie früher die Pankreastryptase verstanden; sie ist im Handel leicht erhältlich.

Labferment.

Auch dieses Enzym erwies sich bei meinen oben beschriebenen Versuchen als basen- und säurebindend. Es verhält sich also amphoter.

Sonst gilt das Labenzym als chemisch mit anderen Enzymen übereinstimmend.

Es zeigt die üblichen Reaktionen der Enzyme.

Seine Lösung in Wasser ist eine kolloidale, d. h. eine Scheinlösung, in Wirklichkeit also eine Suspension feinster Partikel. Es haftet deshalb auch an porösen Niederschlägen, Tierkohle usw. an (Jacoby).

Ammonsulfat fällt die wässerige Lablösung bei 80 bis 100 % Sättigung aus (Fuld und Spiro).

Kochsalz fällt diese Lösung bei 20 % unter Säurezusatz aus (Blumenthal und Lehner).

Somit haben wir bei Lab bis jetzt keine Ursache, von der Annahme seiner Proteinnatur abzugehen.

Die systematische Stellung des Labfermentes innerhalb der großen Gruppe der Enzyme ist noch ziemlich unklar.

Es wird bei den Proteasen, d. i. den den Eiweißkern angreifenden Enzymen, in der Regel aufgeführt, obwohl die Gerinnung der Eiweißstoffe ein noch ziemlich unbekannter Vorgang ist.

Das Lab wird sogar vielfach mit dem Pepsin identifiziert; doch macht das Pepsin schon bei der ersten Untersuchung einen ganz anderen Eindruck.

Meine Versuche über Säure- und Basenbindung beim Pepsin führten zu dem bemerkenswerten Resultat, daß Pepsin unter allen bis jetzt geprüften Enzymen das einzige ist, das weder Säure aus n-Schwefelsäure noch Base aus n-Ammoniaklösung bindet.

Das Labferment bindet beide.

Die Natur des Labfermentes erscheint Oppenheimer[1]) so zweifelhaft, daß er, um der Hauptfrage näherzutreten, zunächst folgende Teilfragen stellt:

a) Ist das Lab überhaupt eine Protease, d. h. greift es sein Substrat, das Casein, unter hydrolytischer Spaltung an?

Diese Frage bejaht er, da bei der Umwandlung von Casein in Paracasein (oder mehrere Paracaseine) eine Verringerung des Komplexes eintritt. „Wahrscheinlich geht die Spaltung sogar weiter, so daß dieselbe Protease auch das Paracasein langsam weiter abbaut. Die Gerinnung bedeutet also einen Abbauprozeß des Caseins.

b) Ist das Labferment völlig selbständig oder hängt seine

[1]) Oppenheimer, Die Fermente, II, S. 554ff.

Sekretion untrennbar mit der des Pepsins und anderer Fermente zusammen? Das ist schwerer zu beantworten.

Manche haben völlige Übereinstimmung behauptet, so daß Lab und Pepsin ein und derselbe Stoff wären, nur in verschiedenem elektrochemischen Zustande.

Tatsächlich hat das Pepsin (in neutraler Lösung) eine Labwirkung (Michaelis).

Doch sprechen viele Befunde auch gegen die Übereinstimmung.

Nach Rakoczy, um nur eins anzuführen, verschwindet beim Rinde das Lab sehr schnell im Laufe der ersten Lebensmonate, während das Pepsin zunimmt. Auch der reine Magensaft des Kalbes enthält in den ersten Monaten viel mehr Lab als später. Das Lab von neugeborenen Pferden, Schweinen usw. verhält sich genau wie das des Kalbes.

Es soll auch Tiere geben, deren Magensaft nur peptische, gar keine Labwirkung besitzt.

Auch bei Bakterien findet man keine Parallelität zwischen Lab und Protease.

Das sind eine Anzahl gewichtige Tatsachen gegen die Einheitsidee.

Vermutlich gibt es im Magen aller Tiere, außer Kalb und Schaf, neben Lab ein Parachymosin, das „chemisch nichts anderes ist als Pepsin und eine relativ geringe lebende Komponente besitzt“.

Kann man die beiden Enzyme trennen oder doch wenigstens verschieden beeinflussen?

Ja; denn nicht alle Labpräparate enthalten Pepsin. Im Kälberlab kann man die labende Kraft durch Erwärmen stark schwächen, ohne die geringe proteolytische wesentlich zu beeinflussen.

Also keine Identität von Lab und Pepsin!

Pepsin.

Mein Präparat löste sich vollständig in Wasser auf (1 g Pepsin in 10 g Wasser), ebenso in n-Ammoniak.

Die Lösung färbte Lackmus rot, der Geschmack war etwas bitter.

Ein Bindevermögen für Basen oder Säuren war nicht nach-

weisbar. Weder n-Schwefelsäure noch n-Salzsäure wurde von meinem Pepsin gebunden. n-Ammoniak wurde auch nicht gebunden.

Darin wich das Pepsin von den andern geprüften Enzymen ab.

Im übrigen ist die chemische Natur des Pepsins noch wenig erkannt.

In manchen neueren Arbeiten wird es als ein Nucleoproteid erklärt. Hingegen gibt Pekelharing an, daß dem Pepsin die Phosphorsäure fehlt, was gegen diese Ansicht spricht.

Einiges über die Definition der Enzyme (ungeformten Fermente).

Da man über die chemische Natur der Enzyme noch vielfach im Zweifel ist, fehlt für eine wirkliche Definition die stoffliche Grundlage.

Dieser Mangel hat wohl auch zum Teil dazu beigetragen, daß man in der Definition manchmal weit über die Grenze hinausgegangen ist, die früher nach Ansicht der Physiologen gezogen war und wohl auch jetzt noch gezogen wird.

Man hat sogar von „anorganischen Fermenten“ gesprochen (Bredig).

Fein verteilte Metalle (und Metalloxyde) sind damit gemeint; ganz besonders das fein verteilte Platin.

Sie haben ja bekanntlich katalytische Wirkungen.

Darin liegt auch faktisch eine Ähnlichkeit mit den echten Enzymen.

Hingegen ist die Art der chemischen Umwandlung eine ganz andere.

Kann man mit Platinsol jemals tryptische oder Gärungswirkungen erzielen?

Umgekehrt ist kein echtes Ferment imstande, die Vereinigung von Wasserstoff und Sauerstoff zu Wasser zu bewirken, oder SO_2 und O zu SO_3 zu vereinigen.

Fein verteiltes Nickel bewirkt eine Hydrogenation von Phenol, Kresol, Xylenol. Welches Zellferment vermag das zu leisten?

Durch Überleiten von Acetylen und Wasserstoff über fein verteiltes Nickel (bei nicht ganz 180°) erhält man Öle von der Zusammensetzung der pennsylvanischen Erdöle. Mit Kobalt und Eisen erhält man Produkte von der Zusammensetzung der kanadischen Erdöle[1]).

[1]) Siehe auch Verfasser in Centralbl. f. Bakt. 21, Nr. 7/8, 1908.

Echte Fermente ertragen niemals ein Erhitzen auf 180°.

Platin vermag freilich H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff zu spalten und gleicht darin der Katalase, aber auch nur dieser. Andere Zellfermente vermögen das H_2O_2 nicht zu spalten.

Die Empfindlichkeit gegen höhere Temperaturen, die so weit geht, daß die Enzyme schon bei 50 bis 70° unwirksam und dauernd inaktiv werden, dann die Existenz eines Temperaturoptimums, das wie beim Protoplasma zwischen der unteren und oberen Grenze der Wirksamkeit liegt, ferner die Schädigung der Enzyme durch dieselben Gifte, durch die auch das Protoplasma geschädigt wird, dann die Möglichkeit, auch auf rein mechanischem Wege Schädigungen zu erleiden, endlich die Neigung der Enzyme, mit der Zeit von selbst dauernd inaktiv zu werden[1]), das alles weist auf das Protoplasma hin, von dem ja alle echten Fermente erzeugt werden. Ohne Protoplasma kein Ferment.

Die Enzyme sind wahrscheinlich aus demselben Stoff gebildet wie das Protoplasma selbst: aus aktivem Protein.

Ob die kolloidale Beschaffenheit, die dem Protoplasma wie auch den Enzymen zukommt, ausreichend ist, um die Aktivität zu erklären, möchte ich bezweifeln.

Wie soll ein Kolloid vermöge seiner Dispersion bei 30° stärker katalytisch wirken als bei 20°?

Kann ein Kolloid „absterben“, ohne daß in den äußeren Verhältnissen irgendetwas geändert wird?

Die Loewsche Anschauung von aktiven Atomgruppen in den Plasma- und Enzymmolekülen, die leicht in passiven Zustand übergehen können (durch Umlagerung), paßt eher in den Tatsachenbestand hinein.

Durch Steigerung der Temperatur werden labile Atomgruppen noch beweglicher und energischer, bis schließlich durch zu hohe Temperatur eine Zerstörung (Umlagerung) erfolgt. Bestimmte Atomgruppen reagieren mit Aldehydgruppen usw.

Wenn nun auch in diesen grundlegenden Dingen keine Einigkeit herrscht, so nimmt man doch mit Befriedigung wahr,

---

[1]) Die pulverigen wie auch die gelösten Enzyme werden bekanntlich im Laufe der Zeit unbrauchbar, d. h. unwirksam, wenn sie Monate und Jahre lang im Schrank stehen.

wie der Begriff Ferment jetzt wieder enger mit dem der Zellen verknüpft wird als vor einigen Jahren. Die Physiologen sprechen nicht von anorganischen Fermenten.

„Ein Ferment ist eine katalytisch wirkende Substanz, die von lebenden Zellen erzeugt wird, ohne daß ihre Wirkung an den Lebensprozeß als solchen gebunden ist. Die Fermente sind also imstande, chemische Prozesse auszulösen, die auch von selbst, wenn auch in langsamerem Verlaufe, einzutreten bestrebt sind. Das Ferment selbst bleibt bei diesem Prozeß unverändert Es wirkt spezifisch, d. h. jedes Ferment richtet seine Tätigkeit nur auf Stoffe von ganz bestimmter struktureller und stereochemischer Anordnung." So liest man in dem bekannten Buche Oppenheimer, Die Fermente. 4. Aufl. 1913, Bd. I, S. 15.

Damit ist zugegeben, daß kein Stoff Anspruch auf die Bezeichnung „Enzym oder Ferment" hat, der nicht in der Zelle erzeugt wurde. Die Entstehung ist an den Lebensprozeß gebunden, nicht immer die Wirksamkeit.

Obwohl die Enzymwirkung der lebenden Zelle zu gute kommen soll, bleibt die Wirksamkeit doch in Ausnahmefällen noch erhalten nach geschehener Loslösung von der Zelle. Man braucht, um dies einzusehen, nur an die als Pulver und Lösungen im Handel befindlichen Enzyme zu denken. Sie sind aber alle nicht von langer Lebensdauer.

Frühere Pflanzenphysiologen haben die Enzyme (damals ungeformten Fermente) als Stoffe definiert, die in der lebenden Zelle gebildet und eventuell ausgeschieden werden, um an Stellen, wo das Protoplasma selbst nicht wirken kann, Lösungs- und andere Wirkungen zu vollbringen. Sie waren ihnen gewissermaßen die Stellvertreter des lebenden Protoplasmas. Das ist noch heute als richtig anzuerkennen.

Ihr in vieler Beziehung protoplasmaähnliches Verhalten hat wohl den Anlaß zu der Bezeichnung Protoplasmasplitter gegeben, und es besteht diese Bezeichnung noch heute zu Recht, wenn man sich die Splitter entsprechend klein denkt, so daß es mehr Plasmamoleküle als mechanisch ablösbare Teile sind.

Was die Auslösung von Prozessen, die auch von selbst langsam eintreten, anbelangt, so ist das die bekannte moderne Definition der katalytischen Vorgänge, bei der man stets vergeblich frägt, wer denn jemals eine langsame Selbstzersetzung

von Stärke, Rohrzucker, Pepton usw. ohne Zutun von Bakterien und Enzymen gesehen habe.

Für die spezifische Wirkung der Enzyme ist eine Verständigung angebahnt worden, indem man auf Strukturverhältnisse im Molekül der Enzyme und ihrer Substrate hinwies. E. Fischers Beispiel vom Schlüssel und Schloß ist bekannt genug. Die Struktur selbst ist noch aufzuklären.

Dazu paßt nun freilich wiederum nicht die Idee, daß die Enzyme lediglich wie Schmiermittel wirken[1]). Denn bei einem Schmiermittel ist die spezifische Struktur der Maschine gleichgültig.

Kurz, die Ansichten sind noch vielfach different. Wohl kein Gebiet der Chemie bedarf noch so sehr der Läuterung wie das der Enzyme, obwohl die „ungeformten Fermente" z. Tl. schon lang bekannt und in praktischer Verwendung sind.

Es ist hier eben nur ein sehr langsames tastendes Vorgehen möglich.

Eine gewisse Unsicherheit haftet den Untersuchungen über Enzyme wie über biologisch-chemische Dinge immer an.

Denn die sich entgegenstellenden Schwierigkeiten sind hier ungewöhnlich groß. Vielfach läßt uns die reine Chemie im Stich, indem sie noch nicht weit genug entwickelt ist, um uns an die Hand zu gehen.

Nachtragsbemerkung.

Leider bin ich zu spät auf eine hier einschlägige Arbeit Ohtas: Darstellung von eiweißfreiem Emulsin (diese Zeitschr. **58**, 329, 1913) aufmerksam geworden. Da meine eigenen Untersuchungen noch nicht abgeschlossen sind und Ohta ebenfalls weitere Mitteilungen über die chemische Natur des Emulsins in Aussicht gestellt hat, so behalte ich mir vor, später nochmals auf das Emulsin zurückzukommen.

Th. Bokorny.

[1]) C. Oppenheimer, a. a. O. S. 17.

Betrachtungen über das Verhalten von C-, H-, O-haltigen organischen Verbindungen gegen Fehlingsche Lösung.

Von
B. M. Margosches.
(Aus dem Laboratorium für chemische Technologie I der Deutschen Technischen Hochschule Brünn.)

(Eingegangen am 3. April 1915.)

Zahlreiche Arbeiten der periodischen Literatur behandeln das Verhalten organischer Verbindungen gegen alkalische Kupferlösungen, insbesondere gegen Fehlingsche Lösung. Die Mehrheit dieser Arbeiten beansprucht analytisch-chemisches Interesse, ein weit geringerer Teil berichtet über die beim Behandeln mit Fehlingscher Lösung entstehenden Oxydationsprodukte[1]). In nur sehr wenigen Arbeiten der einschlägigen Literatur werden jedoch Beziehungen hinsichtlich des Zusammenhanges zwischen Reduktionswirkung und Konstitution der die Fehlingsche Lösung reduzierenden organischen Verbindungen berührt und insbesondere in zusammenfassenden Arbeiten der letzteren Richtung sind des öfteren irrige Angaben zu finden.

In vorliegender Mitteilung wird über Beziehungen in obenbezeichneter Richtung in kurzen Zügen berichtet, wobei als experimentelle Stütze auch Arbeiten aus der einschlägigen Literatur herangezogen wurden. Mitteilungen über das Verhalten der Fehlingschen Lösung und anderer Kupferlösungen[2]) gegen einige organische Verbindungen an der Hand eigenen Versuchsmaterials folgen demnächst.

---

[1]) Vgl. insbesondere die diesbezüglichen Arbeiten von Habermann und M. Hönig und von Nef.

[2]) Bekanntlich zeigen die verschieden zusammengesetzten Kupferlösungen (Soldainische oder Barfoedsche Lösung usw.) nicht immer das gleiche Verhalten. Vgl. hierzu insbesondere die Angaben von Nef, Annal. d. Chem. **335**, 332, 1904.

Nach W. Vaubel[1]) dient die Fehlingsche Lösung „zum Nachweis leicht oxydierbarer Gruppen, wie der Aldehyd- und Ketongruppe:

$$\underset{\displaystyle O}{\overset{\displaystyle R—C—H}{\|}} \quad \text{und} \quad \underset{\displaystyle O}{\overset{\displaystyle R_1—C—R_2}{\|}},$$

wobei die Cupriverbindung zu einer Cuproverbindung, unter Ausscheidung von gelblichem bis rötlichem Kupferoxydul, reduziert wird."

Diese von Vaubel gemachten Angaben über Beziehungen zwischen Reduktionswirkung und Konstitution entsprechen in der angeführten Form den Tatsachen nicht.

Aus der Fähigkeit einer großen Anzahl von Aldehyden, Fehlingsche Lösung zu reduzieren, darf nicht auf eine für die Aldehyde allgemein charakteristische Reaktion geschlossen werden. Besonders irreführend sind jedoch die Angaben hinsichtlich des Verhaltens der Ketone, denn diese reduzieren alkalische Kupferlösungen nicht und die Ketogruppe darf auch keinesfalls als „leicht oxydierbare Gruppe" gekennzeichnet werden.

B. Tollens[2]) war es, der gelegentlich seiner eingehenden Studien über die Eigenschaften und das Verhalten der Aldehyde gefunden hatte, daß wie Acetaldehyd[3]) auch andere Aldehyde der Fettreihe alkalische Kupferlösungen reduzieren[4]), während Aldehyde der aromatischen Reihe dieses Verhalten nicht zeigen[5]). In den Hand- und Lehrbüchern der organischen Chemie wird meistens nur das charakteristische Verhalten der aliphatischen Aldehyde hervorgehoben, des öfteren auch unter Hinweis auf die Tollenssche Arbeit.

---

[1]) W. Vaubel, Die physikalischen und chemischen Methoden der quantitativen Bestimmung organischer Verbindungen 2, 422, 1902.

[2]) B. Tollens, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 14, 1950, 1881.

[3]) Vgl. Magnes-Lahens, Jahresber. d. Chem. 1855, 820.

[4]) Heterozyklische Aldehyde, wie z. B. Furfurol, reduzieren Fehlingsche Lösung.

[5]) Aliphatische und aromatische Aldehyde verhalten sich in vielen Fällen verschieden. So sei daran erinnert, daß nach Henry aliphatische Aldehyde mit Nitromethan (CH_3NO_2) heftig reagieren, während bei aromatischen Aldehyden, nach Priebs, erst bei Gegenwart von Kondensationsmitteln Einwirkung stattfindet. (Vgl. Th. Posner, Chem. Centralbl. 1898, I, 1104.)

Innerhalb der Reihe der aliphatischen Aldehyde zeigen sich allerdings bezüglich ihres Verhaltens gegen Fehlingsche Lösung einige bemerkenswerte Erscheinungen. So ist das Verhalten des Glyoxals, eines Dialdehyds, besonders hervorzuheben. Nach Rosenthalers „Nachweis organischer Verbindungen" (1914, S. 142) reduziert Glyoxal

$$\begin{matrix} H \\ O \end{matrix} \!\!>\! C - C \!<\!\! \begin{matrix} H \\ O \end{matrix}$$

ammoniakalische Silberlösung, während Fehlingsche Lösung nur von der polymerisierten trimolekularen Form reduziert wird. Möglicherweise steht dieses Verhalten mit der leichten Zersetzlichkeit des Glyoxals durch Alkalien im Zusammenhange, da diese Verbindung bereits in der Kälte durch Alkalien in Glykolsäure übergeführt wird:

$$\begin{matrix} C \!<\!\! \begin{matrix} H \\ O \end{matrix} \\ | \\ C \!<\!\! \begin{matrix} O \\ H \end{matrix} \end{matrix} + H_2O = \begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ COOH \end{matrix} .$$

Allerdings wird auch Methylglyoxal ($CH_3.CO.CHO$) durch Alkalien sehr schnell zersetzt[1]), reduziert aber trotzdem Fehlingsche Lösung[2]).

Auf das Verhalten des Metaldehyds, $(C_2H_4O)_3$ oder $(C_2H_4O)_4$, der Fehlingsche Lösung nicht reduziert, sei ebenfalls hingewiesen. Dieses Polymerisationsprodukt ist allerdings auch gegen Kaliumpermanganat indifferent (Beilsteins Handbuch 1, 917), und soll nach neueren Untersuchungen weder Carbonyl- noch Hydroxylgruppen enthalten.

Das Verhalten von Formaldehyd gegen Fehlingsche Lösung und die unter Umständen stattfindende kräftige Reduktionswirkung zu metallischem Kupfer[3]) soll an anderer Stelle, unter

---

[1]) Vgl. u. a. auch A. Joannis' Auffassung des Kaliumcarbonyls als Dikaliumglyoxal. Compt. rend. 158, 874, 1914; Chem. Centralbl. **1914**, I, 1642.

[2]) Rosenthaler, Der Nachweis organischer Verbindungen 1914, 143. — Auf die bezüglich des Reduktionsvermögens des Methylglyoxals einander zum Teil widersprechenden Angaben von Harries und Türk, Ber. d. deutschen chem. Ges. 38, 1632, 1905 und Meisenheimer, ebenda 45, 2640, 1912 sei verwiesen.

[3]) Auf die Reduktion der Fehlingschen Lösung durch Formaldehyd zu Kupferoxydul weist u. a. die U. S. Pharmakopoe hin. Vgl. Carl E. Smith, Chem. Centralbl. **1898**, I, 799.

Berücksichtigung der sonstigen reduzierenden Eigenschaften und der Säurenatur dieses Aldehyds, besprochen werden[1]).

Bezüglich des Verhaltens der aromatischen Aldehyde ist zu bemerken, daß in der oben zitierten Tollensschen Arbeit nur zwei Aldehyde, Benzaldehyd und Salicylaldehyd, namhaft gemacht werden, welche die Fehlingsche Lösung nicht reduzierten[2]). Nach H. Müller und H. v. Pechmann[3]) reduziert auch Phenylglyoxal Fehlingsche Lösung nicht; hingegen reduziert nach F. Tiemann und A. Parrisius[4]) der Methyläther des 2, 4-Dioxybenzaldehyds Fehlingsche Lösung in der Hitze. Das in der Literatur vorliegende Tatsachenmaterial gestattet kein abschließendes Urteil über das Verhalten der aromatischen Aldehyde gegen Fehlingsche Lösung. Dieses kann möglicherweise mit dem bekannten Verhalten der aromatischen Aldehyde gegen Alkalilauge in Zusammenhang gebracht werden[5]); eine Überprüfung einer recht großen Anzahl von aromatischen Aldehyden, auch von solchen, bei denen die —CHO-Gruppe nicht direkt an den Benzolrest gebunden ist, gegenüber Fehlingscher Lösung erscheint somit von Interesse. Daß auch aromatische Verbindungen Fehlingsche Lösung reduzieren, ist durch das Benzoylcarbinol und die Gallussäure als erwiesen zu betrachten.

---

[1]) Bekanntlich reduzieren auch konzentrierte Lösungen von Dextrose, Lävulose usw. besonders neutrale Kupferlösungen zu metallischem Kupfer (Monnet, Reynoso). Vgl. diesbezüglich auch E. O. v. Lippmann, Die Chemie der Zuckerarten **1**, 309, 1904.

[2]) Auf das Verhalten des Benzaldehyds zu benzoesaurem Kupfer im Licht unter Bildung von Benzoesäure, benzoesaurem Kupferoxydul und metallischem Kupfer, welches vor kurzem G. Ciamician und P. Silber, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **48**, 187, 1915, beschrieben haben, soll hier hingewiesen werden. „Die Reaktion gehört zu den gegenseitigen Reduktionen und Oxydationen, die das Licht mit Vorliebe begünstigt."

[3]) H. Müller und H. v. Pechmann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **22**, 2557, 1889.

[4]) Tiemann und Parrisius, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **13**, 2366, 1880.

[5]) Vgl. auch Nef, Annal. d. Chem. **298**, 304, 1897. — Bezüglich der Ansichten über den Mechanismus der Oxydation bzw. Autoxydation des Benzaldehyds vgl. H. Wieland, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **45**, 2606, 1912 und H. Staudinger, ebenda **46**, 3327, 3535, 1913.

Das Verhalten der Ketone gegen Fehlingsche Lösung ist bereits einleitend erwähnt worden; diese werden durch schwache Oxydationsmittel, im Gegensatze zu den Aldehyden, nicht verändert.

Die an Alkyle gebundene Hydroxylgruppe verhält sich gegen Fehlingsche Lösung ebenfalls indifferent, und es reduzieren somit Alkohole Fehlingsche Lösung nicht. Von besonderem Interesse war es, dieses Verhalten bei den mehrwertigen Alkoholen, wie Glycerin, Mannit, Erythrit, Dulcit usw., festzustellen.

Da weder Ketone noch Alkohole Fehlingsche Lösung reduzieren, so ist es hinsichtlich der Beziehungen zwischen Reduktionswirkung und Konstitution von besonderer Bedeutung, daß Ketonalkohole

$$(R—CO—CH_2OH, \quad R_1—CO—CHOH—R_2)$$

Reduktion bewirken, wie dies durch Vornahme von Versuchen mit

Acetol ($CH_3.CO.CH_2OH$),
Dimethylketol ($CH_3.CO.CHOH.CH_3$),
Methyläthylketol ($CH_3.CO.CHOH.C_2H_5$),
Diäthylketol ($C_2H_5.CO.CHOH.C_2H_5$),
Benzoylcarbinol ($C_6H_5.CO.CH_2OH$),
Dioxyaceton ($CH_2OH.CO.CH_2OH$)

sich bestätigen läßt[1]).

Das Verhalten dieser Verbindungen entspricht somit dem bekannten Verhalten der Ketosen.

Die durch diese Verbindungen bewirkte Reduktion wäre entweder den Gruppen $—CO.CH_2OH$, $—CO.CHOH—$ zuzuschreiben, oder man könnte annehmen, daß durch die Wirkung des Alkalis zunächst eine Umlagerung stattfindet, z. B. $—CO.CH_2OH \rightarrow CHO.CHOH—$, und die intermediär sich bildende Verbindung die Reduktion bewirke. Lobry de Bruyn und van Ekenstein haben bekanntlich, anläßlich ihrer Studien über Kohlenhydrate, den Mechanismus solcher Umlagerungen besprochen.

Die bei Anwendung der Fehlingschen Lösung stattfindenden Reaktionen sind in vielen Fällen, insbesondere bei den Zuckerarten, sehr kompliziert. Es kommen unter Verallgemeinerung

---

[1]) Vgl. auch die von Nef, Annal. d. Chem. 335, 274, 1904, gegebene Erklärung der Wirkung des Acetols.

der von Tollens speziell für die Zuckerarten aufgestellten Sätze folgende Wirkungen in Betracht.

1. Die Wirkung des Alkalis auf die die Reduktion bewirkende Verbindung.

2. Die Oxydationswirkung des Kupferoxyds auf die die Reduktion bewirkende Verbindung.

3. Die Oxydationswirkung des Kupferoxyds auf die durch das Alkali entstandenen Produkte.

Bei den Ketonalkoholen könnten somit auch Oxydationswirkungen der letztgenannten Art mitspielen.

Das eingehend studierte Verhalten der verschiedenen Zuckerarten gegen Fehlingsche Lösung wird hier nicht mit einbezogen; das diesbezügliche reichhaltige Material ist in den Werken von E. O. v. Lippmann[1]) und von B. Tollens[2]) kritisch bearbeitet worden und daher leicht zugänglich. Es sei nur erwähnt, daß die Eigenschaft der Dextrose, Fehlingsche Lösung zu reduzieren, auf ihre Aldehydnatur zurückzuführen ist. Die gleiche Eigenschaft der Lävulose kann in der oben gedeuteten Weise ihre Erklärung finden, so führt Tollens die Reduktionswirkung der Ketosen (op. cit. S. 18) auf „die Gegenwart von CO neben einem mit Hydroxyl versehenen C-Atome" zurück.

Im ähnlichen Sinne erklärt Tollens das Verhalten des Rohrzuckers, der Maltose und des Milchzuckers: „im Rohrzucker sind keine mit Hydroxyl und Sauerstoff zu gleicher Zeit verbundenen Kohlenstoffatome vorhanden", daher seine Indifferenz gegen Fehlingsche Lösung; beim Milchzucker und bei der Maltose ist dagegen „noch ein mit Sauerstoff und Hydroxyl zugleich verbundenes Kohlenstoffatom" zugegen[3]). Nach V. v. Richters Chemie der Kohlenstoffverbindungen (1, 722, 1909) enthalten noch „Milchzucker und Maltose die Aldosegruppe [CH(OH).CHO], da sie Fehlingsche Lösung beim Kochen reduzieren".

Der dreiwertige Alkohol, das Glycerin $CH_2OH.CHOH.CH_2OH$ reduziert Fehlingsche Lösung nicht (s. o.); der Glycerinaldehyd $CH_2OH.CHOH.CHO$ reduziert Fehlingsche Lösung bei gewöhn-

---

[1]) E. O. v. Lippmann, Chemie der Zuckerarten. 1904.

[2]) B. Tollens, Kurzes Lehrbuch der Kohlenhydrate. 1914.

[3]) B. Tollens, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 16, 923, 1883.

licher Temperatur.[1]) Versetzt man jedoch den Glycerinaldehyd mit Ätznatron und läßt bei 0° 4 bis 5 Tage stehen, so bildet sich Acrose ($C_6H_{12}O_6$), die Fehlingsche Lösung nur in der Wärme reduziert[2]).

Ein ähnliches Verhalten wie Glycerinaldehyd bzw. Acrose zeigen auch viele andere C-, H-, O-haltige Verbindungen; manche reduzieren Fehlingsche Lösung bei gewöhnlicher Temperatur, andere üben dagegen bei gewöhnlicher Temperatur nicht oder nur sehr langsam Reduktionswirkung aus, während sie in der Wärme rasch reduzieren[3]). In vielen Fällen dürfte bei den erst in der Wärme stattfindenden Reduktionen die Einwirkung des Alkalis eine Rolle spielen.

Auf dem Gebiete der Chemie der Dextrine sind die Verhältnisse bekanntlich noch nicht geklärt, und dementsprechend sind auch die in der Literatur vorhandenen Angaben über das Reduktionsvermögen der verschiedenen bei der Stärkehydrolyse erhaltenen Dextrine sich widersprechende.

Über das Verhalten der Cellulose und ihrer Derivate, insbesondere der hydratisierten Cellulosen gegen Kupferlösungen sei auf die Arbeiten und auf das bekannte Buch von C. G. Schwalbe verwiesen.

Ziehen wir noch die Carboxylgruppe $-C\begin{smallmatrix}/\!\!/ O \\ \backslash OH\end{smallmatrix}$ in den Kreis unserer Betrachtungen, so ist hervorzuheben, daß organische Säuren (R.COOH) Fehlingsche Lösung nicht reduzieren.

Von den einbasischen gesättigten Säuren ist das Verhalten der Essigsäure und der höheren Homologen dieser Reihe bekannt, während über das Verhalten der Ameisensäure gegen Fehlingsche Lösung bzw. gegen alkalische Kupferlösungen des öftern die Angabe zu finden ist, daß dieser Reduktionsvermögen zukommt.

Die Auffassung der Ameisensäure als Oxyaldehyd $OH-C\begin{smallmatrix}/\!\!/ O \\ \backslash H\end{smallmatrix}$ und ihre in vielen Fällen festgestellte reduzierende Wirkung verleiht den auf Fehlingsche Lösung sich beziehenden Angaben

---

[1]) Formalglycerin $C_4H_8O_3$, Acetaldehydglycerin $C_5H_{10}O_3$ und Glycid $C_3H_6O_2$ reduzieren Fehlingsche Lösung nicht. (Nef, Annal d. Chem. 335, 216, 1904.)

[2]) Vgl. Beilsteins Handbuch 1, 967 und 1038.

[3]) Vgl. auch Nef, Annal. d. Chem. 335, 271, 1904.

betreffend das Reduktionsvermögen der Ameisensäure eine gewisse Wahrscheinlichkeit. Die Feststellung des Verhaltens der Ameisensäure gegen Fehlingsche Lösung ist nicht nur als „Beitrag zur Kenntnis der Ameisensäure" von Bedeutung, sondern, wie aus folgendem ersichtlich ist, von viel größerer Tragweite. Bekanntlich reduziert Chloroform Fehlingsche Lösung in der Wärme, und in der einschlägigen periodischen und didaktischen Literatur wird, mit wenigen Ausnahmen, dieses Verhalten des Chloroforms auf ein Reduktionsvermögen der durch die Alkaliwirkung entstehenden Ameisensäure zurückgeführt.

Gelegentlich einer in Gemeinschaft mit Richard Baru unternommenen Experimentalstudie, betreffend „das Verhalten des Chloroforms gegen Alkalien und alkalische Kupferlösungen", wurde auch das Verhalten der Ameisensäure und Orthoameisensäure gegen Fehlingsche Lösung überprüft. Die demnächst, unter Heranziehung der Literatur in dieser Zeitschrift wiederzugebenden Versuche ergaben, daß Fehlingsche Lösung durch Ameisensäure nicht reduziert wird. Die Ameisensäure reiht sich somit in dieser Beziehung ihren Homologen vollkommen an und verhält sich trotz ihrer Aldehydnatur gegen Fehlingsche Lösung indifferent.

Aus der großen Reihe der organischen Säuren wollen wir schließlich nur noch die Oxysäuren[1]) besprechen.

Berücksichtigt man die oben wörtlich wiedergegebenen Angaben von Tollens, betreffend das Verhalten von Lävulose, Milchzucker, Maltose, so müßte man von vornherein sämtlichen Oxysäuren Reduktionsvermögen für Fehlingsche Lösung zusprechen. Daß aber die Oxysäuren — zumindest ein großer Teil derselben[2]) — Fehlingsche Lösung nicht reduzieren, ist eine allgemein bekannte Tatsache, bildet doch die Weinsäure (Dioxybernsteinsäure) einen integrierenden Bestandteil der Fehlingschen Lösung.

---

[1]) Vgl. die Arbeiten von H. Kiliani, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **14**, 2529, 1881 und **20**, 329, 2710, 1887.

[2]) Über das reduzierende Verhalten der Dioxyweinsäure vgl. Rosenthaler, Chem. Centralbl. **1904**, 1, 211. Im Zusammenhang mit dieser Arbeit sei auch auf die Arbeiten von Jowitschich, Chem. Centralbl. **1897**, 2, 1163 und von Repiton, ebenda **1908**, 2, 729 hingewiesen. — Ferner sei hier an die Reduktionswirkung der Gallussäure (3, 4, 5-Trioxybenzoesäure) erinnert.

Der Gruppe —$CO.CH_2OH$ kommt, wie aus obigem ersichtlich ist, Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Lösung zu; die Glykolsäure $\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ COOH \end{matrix}$ nun, die ihrer Konstitution nach diese Gruppe enthält, reduziert jedoch Fehlingsche Lösung nicht[1]). Ebenso verhält sich die die Gruppe —CO.CHOH— enthaltende Äpfelsäure usw. usw.

Um das reduzierende Verhalten der Gruppen —CO—H, —CO—CH_2OH, —CO.CHOH— mit dem Verhalten der Ameisensäure, Glykolsäure, Äpfelsäure, Weinsäure usw. in Einklang zu bringen, bedarf es somit bezüglich der Reduktionswirkung der genannten Gruppen der Einschränkung, daß das betreffende Carbonyl, wie auch das betreffende Hydroxyl obiger Gruppen nicht der Carboxylgruppe angehören dürfen, wenn den obengenannten Gruppen Reduktionsvermögen zukommen soll.

* * *

Die Frage, welchen Atomgruppen Reduktionsvermögen für Fehlingsche Lösung zukommt, ist bei Betrachtung des bisher vorliegenden Tatsachenmaterials als solche recht komplizierter Natur zu bezeichnen und sie ist noch weniger geklärt zu betrachten als das Verhalten C-, H-, O-haltiger organischer Verbindungen gegen ammoniakalische bzw. alkalisch-ammoniakalische Silberlösung. Es scheinen nämlich nicht nur die oben besprochenen Verhältnisse allein in Betracht zu kommen. Für die Silberlösung ist die allerdings nicht weiter überprüfte Literaturangabe, daß Acetylpropylalkohol $CH_3COCH_2CH_2CH_2OH$ Silbersalze nicht reduziere, während Acetylbutylalkohol $CH_3COCH_2CH_2CH_2CH_2OH$ in der Wärme ammoniakalische Silberlösung reduziert[2]) von Interesse[3]).

Das Verhalten einer Verbindung gegen Fehlingsche Lösung kann bei der Feststellung ihrer Konstitution Anhaltspunkte

[1]) Vgl. indessen über das Verhalten der Glykolsäure gegen Kupferoxyd Habermann und Hönig, Jahrb. d. Chem. 1882, 1119, und über das Verhalten der Ameisensäure gegen Fehlingsche Lösung Rosenthaler, Chem. Centralbl. 1904, I, 212.

[2]) Vgl. Beilstein, Handb. d. organ. Chemie 1, 268 und 269.

[3]) Vgl. auch Nef, Annalen der Chemie 335, 312, 1904.

geben, darf aber nicht ausschlaggebend sein. Reduktionsreaktionen sind bekanntlich nicht immer einwandfrei, und im vorliegenden Falle wäre noch besondere Rücksicht auf intermediär stattfindende Umlagerungen bzw. Umsetzungen zu nehmen. Bei Feststellung der Konstitution der Zuckerarten hat bekanntlich die Fehlingsche Lösung gute Dienste geleistet. Systematische Untersuchungen mit einer großen Anzahl von Verbindungen unter besonderer Berücksichtigung der jeweiligen Reduktionstemperatur könnten wohl für die Frage über die Beziehungen zwischen Reduktionswirkung und Konstitution von einiger Bedeutung sein.

Bei Heranziehung des Verhaltens der Fehlingschen Lösung zu Konstitutionsfragen ist auch auf das Verhalten der betreffenden Verbindung gegen Fehlingsche Lösung nach stattgehabter Hydrolyse (mit Säuren) zu prüfen. So berichtet Tollens in seinem mehrfach zitierten Buche (S. 199), daß die Glucosepentacetate mit Fehlingscher Lösung erst nach der Hydrolyse reagieren, „es sind folglich 5 OH der Glucose in ihnen gebunden und es ist keine freie Aldehydgruppe vorhanden“ [1].

[1]) Vgl. auch den Nachweis der Digitalisglukoside in Rosenthaler's Nachweis org. Verbindungen 1914, S. 821.

Über die proteolytische Wirkung der Eiweißabbauprodukte.

Proteolyse mit Trypsindialysaten, Wirkung von gallensauren Alkalien, Bedingungen der Eiweißlöslichkeit.

Von

E. Herzfeld.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Medizinischen Universitätsklinik Zürich.)

(Eingegangen am 3. April 1915.)

In einer jüngst veröffentlichten Arbeit[1]) hat Verfasser die proteolytische Fähigkeit von Aminosäuren und Peptonen nachgewiesen und sprach die Möglichkeit aus, daß die proteolytischen Fermente in der Hauptsache mit den entsprechenden Eiweißabbauprodukten identifiziert werden können. Ist diese Annahme richtig, so müssen die Fermentpräparate den obigen Eiweißabbauprodukten entsprechende chemische Reaktionen zeigen. So konnte auch gefunden werden, daß das Pepsin die Eigenschaften der Peptone, das Trypsin aber die der Aminosäuren aufwies. Es war folglich zu erwarten, daß die Trypsinpräparate dialysabel sind und daß das Dialysat eine abbauende Fähigkeit besitzt, während der in der Hülse zurückgebliebene Rückstand diese Fähigkeit verloren oder wenigstens davon eingebüßt hat. Der folgende Versuch sollte obige Frage entscheiden: 1 ccm = 10 mg einer 1 % igen wässerigen Trypsinlösung brachte man einmal in ein Dialysierkölbchen mit 19 ccm Wasser, ferner 1 ccm = 10 mg Trypsin in eine Dialysierhülse, ebenfalls in einem Dialysierkölbchen mit 19 ccm Wasser als Außenflüssigkeit, überschichtete beide mit Toluol und ließ 24 Stunden im Brutschrank stehen. Im ersten Kölbchen befanden sich also 10 mg Trypsin in 20 ccm Wasser (a). Vom

[1]) Diese Zeitschr. 68, H. 5/6, S. 402 bis 435, 1915.

zweiten Kölbchen entnahm man die Hülse samt Inhalt, füllte diese in einen Meßzylinder und ergänzte mit Wasser bis 20 ccm (b); ebenso brachte man das Dialysat auf 20 ccm (c).

a) 10 mg Trypsin in 20 ccm Wasser,

b) Dialysierrückstand von 10 mg Trypsin in 20 ccm Wasser,

c) Dialysat von 10 mg Trypsin in 20 ccm Wasser.

Man setzt je 1 ccm von a, b und c mit 100 mg Albumin (frei von auskochbaren, mit Ninhydrin reagierenden Stoffen) in geprüften Hülsen mit 20 ccm Wasser als Außenflüssigkeit an, überschichtet mit Toluol und läßt 24 Stunden im Brutschrank stehen. Die Dialysate werden sodann mit je 0,5 ccm 1 %iger Ninhydrinlösung in Porzellanschalen auf dem Wasserbade eingetrocknet, der Trockenrückstand portionsweise mit 90 %igem Alkohol gelöst und auf ein bestimmtes Volumen gebracht. Die Lösungen werden im Colorimeter mit einer Glykokoll-Standardlösung verglichen[1]). Zur Herstellung dieser Lösung dampft man in einer Porzellanschale auf dem Wasserbade 0,5 ccm (0,5 mg) einer 0,1 %igen Glykokollösung mit 0,5 ccm 1 %igen Ninhydrinlösung zur Trockne ein, löst den Rückstand portionsweise in 90 %igem Alkohol und füllt bis 50 ccm auf. Wenn „a" die Höhe (Schichtdicke) der Vergleichslösung, „b" die der zu prüfenden Lösung ist, so verhalten sich a : b wie x : 0,5, vorausgesetzt, daß die zu prüfende Lösung auch bis 50 ccm aufgefüllt ist.

$x = \frac{a}{b} \cdot 0{,}5$, der Quotient $\frac{a}{b}$ kann einfacher mit „q" bezeichnet werden.

Die Resultate des Versuches sind aus folgender Tabelle ersichtlich.

Nr.	Versuch	q Quotient der Schichtdicken	100 ccm Lösung enthalten mg Glykokoll
1	100 mg Albumin + 1 ccm a	0,91	46
2	100 „ „ + 1 „ a	0,83	42
3	100 „ „ + 1 „ b	Spuren	Spuren
4	100 „ „ + 1 „ b	Spuren	Spuren
5	100 „ „ + 1 „ c	0,50	25
6	100 „ „ + 1 „ c	0,45	23

Hieraus können folgende Tatsachen festgestellt werden.

[1]) Münch. med. Wochenschr. 27, 1503, 1914.

Durch Dialysieren geht der wirksame Teil des Trypsins in das Dialysat über. Der in der Dialysierhülse zurückgebliebene kolloidale Rückstand ist fast vollständig unwirksam geworden durch das Hinausdiffundieren der mit Ninhydrin reagierenden Stoffe, Da nun solche Stoffe bei guten Trypsinpräparaten in größeren Mengen vorhanden sind, als in minderwertigen, scheint die Behauptung des Verfassers, daß im Trypsin der wirksame Teil aus einem Gemisch von Aminosäuren besteht, auch auf diese direkte Weise bewiesen zu sein. Daß der hinausdiffundierte Teil nicht ebenso stark wirksam ist, wie die nichtdialysierte Kontrolle, spricht dafür, daß einerseits die Kolloide von der wirksamen Komponente noch etwas adsorbiert enthalten, andererseits aber die Anwesenheit der Kolloide vielleicht durch die Oberflächenvergrößerung auf die Proteolyse einen günstigen Einfluß ausübt.

Beim weiteren Studium über die proteolytische Wirkung von Aminosäuren hat Verfasser gemeinsam mit S. *Ackerberg*[1]) gefunden, daß *die aliphatischen Aminosäuren eine stärker abbauende Wirkung haben als die aromatischen. Besonders stark war die Wirkung des glucocholsauren Natriums und eines Gemisches von gallensauren Alkalien* (aus Rindergalle krystallinisch hergestellt). Ein solches Gemisch von gallensauren Alkalien konnte sogar Fibrinflocken in sichtbarer Weise lösen. Folgender Versuch kann die Wirkung leicht demonstrieren.

1.	2 g Fibrinflocken	(frisch vom Blut ausgewaschen) in 100 ccm Wasser,	mit Toluol überschichtet.
2.	2 g „	+ 0,5 g Gemisch von gallensauren Alkalien in 100 ccm Wasser,	
3.	2 g „	in 100 ccm 0,5 % Na_2CO_3,	
4.	2 g „	+ 0,5 g Gemisch von gallensauren Alkalien in 100 ccm 0,5 % Na_2CO_3.	

Schon nach etwa 5 Stunden Stehen im Brutschrank gab eine Probe (10 ccm) aus dem Kolben 2 mit Sulfosalicylsäure und Essigsäure eine deutliche Trübung, wogegen eine Probe

[1]) Inaug.-Diss. Zürich 1915.

aus Kolben 1 negativ ausfiel. Probe 4 gab sogar schon eine ziemlich stark positive Reaktion, hingegen war 3 nur schwach positiv. Nach 24 Stunden war im Kolben 4 ein großer Teil des Fibrins in Lösung gegangen.

Die mit Sulfosalicylsäure und Essigsäure erzeugte Fällung löste sich beim Erwärmen zum Teil auf, was die Anwesenheit von Albumosen anzeigt. Es handelt sich also hier nicht allein um eine eiweißlösende Eigenschaft der gallensauren Alkalien, sondern vielmehr um eine katalytische Fähigkeit derselben bei der Hydrolyse von Eiweißkörpern, wobei das unlösliche Eiweiß in Lösung gebracht wird. Der Vorgang wäre so denkbar, daß unlösliches Eiweiß bereits in Wasser einer schwachen Hydrolyse unterworfen ist, wobei sehr geringe Mengen von Eiweißabbauprodukten, Albumosen, Peptone und Aminosäuren entstehen, durch Zusatz von gallensauren Alkalien wird diese Spaltung wesentlich beschleunigt. Zur Lösung von Eiweißkoagula muß demnach vorerst eine teilweise Spaltung erfolgen. Je mehr von den Spaltprodukten entstehen, um so mehr geht vom unlöslichen Eiweiß in Lösung, so daß man den Eindruck gewinnt, als ob die entstandenen Abbauprodukte das Eiweißkoagulum in kolloidalem Zustand zerteilen können. Eine solche „peptisierende Wirkung“ der Eiweißabbauprodukte ist noch deutlicher in sodaalkalischer Lösung, wobei vielleicht die Alkalisalze der Abbauprodukte für die „Peptisation“ günstiger sind.

Unlösliche oder koagulierte Eiweißkörper können aber auch durch starke Alkalien oder Säuren allein in Lösung gebracht werden. Vielleicht wird hier die peptisierende Wirkung durch die gebildeten Verbindungen der Säuren oder Alkalien mit den Spaltprodukten hervorgerufen. Bei der Peptisation ist zunächst die Säure oder das Alkali beteiligt, die einige Bausteine vom Eiweiß absprengen und mit ihnen Verbindungen eingehen. Dieser Prozeß ist zwar schon eine Hydrolyse, führt aber zunächst zur Auflösung des Koagulums in den kolloidalen Zustand, womit die Angriffsoberfläche für die Hydrolyse vergrößert wird, und nun setzt die eigentliche Spaltung ein. Die als Endprodukte resultierenden Aminosäuren können nach folgenden Typen erscheinen.

1. $—NH_2.COOH$: Eine solche Lösung enthält äußerst

wenig Ionen und gleich viele H und OH, sie reagiert daher neutral und leitet den elektrischen Strom fast gar nicht.

2. —NH_2.HCl.COOH: Solche Lösung reagiert sauer und leitet den elektrischen Strom teils wie Salzsäure, teils wie ein salzsaures Salz.

3. —NH_2.COONa: Die Lösung reagiert alkalisch und leitet den elektrischen Strom teils wie Natronlauge, teils wie ein Salz derselben.

4. —NH_2.$CaCl_2$.COOH.XH_2O: Solche chemisch einheitliche Verbindungen geben nach P. Pfeiffer und J. v. Modelski[1]) Aminosäuren und Polypeptide mit Neutralsalzen. Solche Körper sind nach stöchiometrisch einfachen Verhältnissen zusammengesetzt und entstehen schon beim Verdunsten der wässerigen Lösung der Komponenten bei gewöhnlicher Temperatur. Die Anwesenheit einer Spur Essigsäure begünstigt die Bildung dieser Verbindungen, die auch in wässeriger Lösung existenzfähig sind.

Je nach der Anwesenheit von Wasser, Säuren, Alkalien und Salzen werden bei der Hydrolyse die obigen vier Typen von Aminosäuren resultieren. Aber auch bei der Eiweißsynthese können sich derartige Aminosäuren beteiligen; so wären die Reaktionen verschiedener Eiweißkörper erklärlich. Bekanntlich reagieren die Albumine neutral, die Globuline, Phosphoglobuline, Nucleoproteide und Glucoproteide sauer, die Histone und Protamine alkalisch. Vielleicht sind diese Eiweißarten aus den entsprechenden neutralen, sauren oder basischen Aminosäuren aufgebaut, oder es sind noch solche Aminosäuren als Verunreinigung vorhanden. Es wäre denkbar, daß bei der Isolierung der Eiweißkörper zufolge ihrer kolloidalen Natur noch unverbrauchte Aminosäuren adsorbiert enthalten. Solche Eiweißkörper wären also dadurch charakterisiert, daß in ihren Lösungen neben dem kolloidalen Eiweiß noch die entsprechenden neutralen, sauren oder basischen Abbauprodukte zugegen sind. Alle Reaktionen also, die geeignet sind, die Abbauprodukte aus dem gelösten Zustand in den unlöslichen zu überführen, bedeuten eine Beseitigung dieser Lösungsfaktoren und führen zu einer Fällung der Eiweißkörper. Das gründlichste Mittel zur Entfernung der Abbauprodukte zwischen den Teilchen des Eiweißkolloids ist das

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 329, 1912.

Erhitzen, wobei die Partikelchen sich zusammenballen und von den adsorbierten, löslichen Abbauprodukten befreit werden.

Bei der Fällung mit Alkohol kommt zu der wasserentziehenden Wirkung auch die fällende Wirkung auf die Abbauprodukte hinzu, wodurch auch das Kolloid nicht in Lösung bleiben kann.

Beim „Aussalzen“ der Eiweißkörper mit Neutralsalzen könnten vielleicht komplexe Verbindungen (Pfeiffer und Modelski) entstehen, welche die Löslichkeit von Eiweiß beeinträchtigen.

Mit Schwermetallsalzen bilden sich meistens unlösliche Verbindungen von Aminosäuren und Peptonen, wodurch die lösende Ursache verschwindet und Eiweiß ausfällt.

Auf Zusatz von wenig Mineralsäure können nach Typus 2 weniger lösliche Aminosäuren frei werden, oder schwer lösliche saure Verbindungen entstehen, wodurch das Kolloid sich abscheidet. Bei Zusatz von viel starker Säure löst sich Eiweiß auf, wahrscheinlich durch reichliche Bildung von Spaltprodukten.

Interessant ist, daß Alkalien nicht als Eiweißfällungsmittel gebraucht werden können, dagegen ist es bekannt, daß sie sehr leicht Eiweiß lösen. Hierbei werden wahrscheinlich Aminosäuren vom Typus 3 abgespalten, die wasserlöslich sind und auch Eiweiß in Lösung halten können.

Obige Überlegungen können auch bei der Definition der koagulierbaren und nicht koagulierbaren Eiweißkörper angewandt werden. Die ersteren bestehen demnach vorwiegend aus kolloidalem Eiweiß und daneben noch aus Abbauprodukten; die letzteren aber enthalten mehr Spaltprodukte und weniger kolloidales Eiweiß. Wenn die Koagulierbarkeit als eine typische Eigenschaft der Eiweißkörper angesehen werden kann, so müssen alle übrigen, nicht koagulierbaren Eiweißstoffe schon als Abbaustufen bezeichnet werden. Die eigentlichen Eiweißkörper wären demzufolge nur die durch Kochen denaturierten Eiweiße, da diese am gründlichsten von ihren Abbauprodukten befreit sind. Folglich müßten in allen Eiweißstoffen, die nicht durch Auskochen gereinigt worden sind, noch Abbauprodukte zu finden sein. Tatsächlich konnte Verfasser in 28 tierischen und 6 pflanzlichen Eiweißen mehr oder weniger auskochbare Eiweißspaltprodukte nachweisen.

Daß die Anwesenheit von Eiweißabbauprodukten bei der Peptisation und auch beim Abbau eine wichtige Rolle spielt, konnte experimentell bestätigt werden. Einige Eiweißkörper wurden sowohl in nativem wie auch in denaturiertem Zustande einmal mit Trypsin, ferner mit Aminosäurengemischen proteolysiert. Es stellte sich heraus, daß der Abbau der nativen Eiweißkörper viel schneller erfolgte als der der denaturierten, und zwar verhielten sich hierbei die Aminosäuren dem Trypsin analog. Es war auch der Gedanke naheliegend, daß ein Eiweißkoagulum durch Zugabe seiner, durch Kochen entfernten Abbauprodukte wieder in Lösung gebracht werden kann. Der folgende Versuch ist auch in diesem Sinne ausgefallen: 5 g Hühnereiweiß wurden bei 37° in 500 ccm Wasser gelöst, in der Lösung das Albumin durch Kochen und Ansäuern mit verdünnter Essigsäure koaguliert und das gut durchgerührte Reaktionsgemisch in zwei Teile geteilt. Die ersten 250 ccm enthielten Eiweißflocken nebst Abbauprodukten in saurer Lösung; man fügte 1,25 g Natriumcarbonat hinzu und überschichtete mit Toluol. Die zweiten 250 ccm wurden filtriert, das Albumin mit heißem Wasser gewaschen und dann mit Alkohol und Äther getrocknet; dieses Koagulum wurde ebenfalls in 250 ccm 0,5 %iger Natriumcarbonatlösung gebracht und mit Toluol überschichtet. Nach mehreren Stunden Stehen im Brutschrank konnte beobachtet werden, daß im ersten Kolben, wo die Abbauprodukte zugegen waren, die großen Eiweißflocken sich feiner verteilt haben und die Lösung allmählich trübe geworden ist; im zweiten Kolben war dagegen das Koagulum unter wasserklarer Lösung. Man nahm je 10 ccm von beiden Kolben, zentrifugierte sie und prüfte mit Sulfosalicylsäure und Essigsäure; in der ersten Probe trat eine deutliche Trübung auf, während die zweite klar blieb. Nach 24 Stunden gab Probe 1 mit Sulfosalicylsäure schon eine flockige Fällung, dagegen blieb Probe 2 klar. Wenn auch nicht alle Eiweißflocken in Lösung gingen, war, namentlich im Vergleich mit der Kontrolle, die lösende Wirkung der Abbauprodukte eine verhältnismäßig große.

Über den Yoghurtbacillus.

Von

F. Ducháček.

(Eingegangen am 9. April 1915.)

Effront[1]) erzielte mit dem Bacillus bulgaricus, dem Hauptfaktor der bulgarischen Sauermilch (Yoghurt), Ergebnisse, die wesentlich von den Arbeiten der Forscher des Pasteurschen Institutes in Paris abweichen.

So haben Cohendy[2]), Bertrand und Weißweiller[3]), Bertrand und ich[4]) übereinstimmend gefunden, daß Bacillus bulgaricus, der aus dem Yoghurt isoliert wurde, vor allem die Lactose und noch einige andere einfache Zuckerarten vergärt; die Glucose, Galaktose, Mannose und Fructose werden durch ihn beinahe quantitativ in Milchsäure übergeführt. In der Milch erreicht die Menge dieser Säure leicht 25 g pro Liter; nebst dem wurden bei diesem Maximum der Milchsäure auch noch eine kleine Menge Bernsteinsäure (etwa 0,5 g), beinahe dieselbe Menge Essigsäure und Spuren von Ameisensäure festgestellt. Das Yoghurtferment greift Fette nicht an und zersetzt nur ein Zehntel des in der Milch vorhandenen Caseins; der Rest dieser stickstoffhaltigen Substanz wird durch die gebildete Acidität gefällt, wobei das Koagulum jedoch fest bleibt, wie lang auch die Kontaktdauer mit den Mikroben sein mag.

Diese aus übereinstimmenden Versuchen des Pasteurschen Institutes in Paris resultierende biochemische Diagnose wurde von Effront (l. c.) nicht anerkannt. Derselbe behauptet, daß Bacillus bulgaricus im Gegenteil ein proteolytisches Ferment

---

[1]) Note présentée à l'Académie des Sciences, Paris, le 28. nov. 1910, **151**, p. 1007.

[2]) Compt. rend. Soc. Biol. **1906**, 27 II et 17 III.

[3]) Annales de l'Inst. Pasteur **20**, 977, 1906; Annal. d. Chem. **351**, 486, 1906.

[4]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc., Paris **148**, 1338, 1909; Annales de l'Inst. Pasteur **23**, 402, 1909.

sei, das Casein spaltet und die Milch in eine lichtgelbe Flüssigkeit überführt, die später dunklere Färbung annimmt.

In seiner Kritik der Arbeit Effronts hebt Bertrand[1]) hervor, daß das Bacterium Effronts aus den im Handel käuflichen Präparaten gewonnen wurde, und glaubt, daß diese Differenzen entweder durch eine biochemische Variation dieses Bacillus, die mit der Anordnung des Versuches irgendwie zusammenhängt oder aber durch das Eindringen eines fremden Mikroben, der vom bulgarischen Fermente verschieden ist, bedingt sind.

Zur Prüfung dieser Einwendungen hat Effront[2]) vergleichende Versuche mit dem typischen Bacillus, der von Bertrand und seinen Mitarbeitern verwendet wurde, und jenem, der in zahlreichen Medizinalpräparaten des Handels enthalten ist, angestellt. Die aus diesen Präparaten isolierten Bakterien waren durchweg proteolytische Fermente; keines der Medizinalpräparate enthielt aber den typischen Yoghurtbacillus. Effront hat zwar die früher erwähnte biochemische Diagnose des Yoghurtbacillus anerkannt, behauptet aber, ohne genügende Belege dafür anzugeben, daß die festgestellten Unterschiede in der Wirkungsweise des Bacillus Bertrands und den Fermenten der Medizinalpräparate nicht durch verschiedene Bacillen verursacht werden, sondern daß der Grund in der biochemischen Variation desselben Bacillus zu suchen sei. Zu dieser Anschauung gelangte er durch den folgenden Versuch:

„Wird der typische bulgarische Bacillus in eine Nährlösung, die Pepton, Glucose und Kreide enthält, eingeimpft, so verhält sich dieser wie ein Milchbacillus bis zu dem Zeitpunkte, wo die gesamte Zuckermenge verschwindet. Überlassen wir nun die Kultur sich selbst, so bedeckt sich die Oberfläche der Lösung nach 14 Tagen mit einem Häutchen, die Bakterien füllen sich mit Sporen, und in diesem Stadium verhält sich die Kultur genau wie die Bacillen aus den Medizinalpräparaten."

Die aus dieser Arbeit sich ergebenden Schlüsse würden jedenfalls, wenn sich ihre Richtigkeit bestätigen sollte, einen wichtigen Beitrag zur Kenntnis der biochemischen Variationen

---

[1]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **151**, 1161, 1910.

[2]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **152**, 463, 1911.

der Bakterien liefern. Diese Frage, hauptsächlich aber der Umstand, daß die Arbeit Effronts imstande ist eine bedenkliche Verwirrung hervorzurufen und die Anschauungen der Forscher, die den Yoghurt oder Yoghurtpräparate zu Heilzwecken verwenden, ins Wanken zu bringen, veranlaßten mich zu einem weiteren Studium der beiden Bakterien.

Zu den Versuchen wurde mir eine Reinkultur des Bacillus bulgaricus (im weiteren mit B-Bac. bezeichnet) von Prof. Metschnikoff zur Verfügung gestellt; das proteolytische Ferment wurde direkt einer Sendung Effronts entnommen (im weiteren mit E-Bac. bezeichnet). Die Ergebnisse der Versuche, namentlich jener, deren Details im experimentellen Teile enthalten sind, führten zu folgenden Schlußfolgerungen:

1. Schon bei der Wahl des Nährmediums wurden in dem Verhalten der beiden Bakterien bedeutende Unterschiede wahrgenommen. E-Bac. gedeiht ausgezeichnet in allen üblichen Nährlösungen, wogegen der echte B-Bac. in dieser Beziehung sehr wählerisch ist.

So wächst in zuckerfreien Lösungen, wenn auch ihre Zusammensetzung sonst günstig ist, B-Bac. gar nicht, da ja die Kultur dieses Bacteriums ohne Zucker undenkbar ist. Dagegen ist für E-Bac. der Zuckerzusatz nicht unbedingt notwendig, zumal derselbe schon in Lösungen von Pepton allein in destilliertem Wasser sich sehr gut entwickelt und reichlich Häutchen bildet.

Für die Existenz des B-Bac. ist die Art des Zuckers maßgebend. Entschieden günstig ist Glucose, Galaktose und Lactose, doch auch Lävulose und Mannose sind vergärbar, wogegen Saccharose und Maltose zur Bereitung seines Nährmediums vollständig unzulässig sind; B-Bac. vermag diese Zuckerarten auch in Gegenwart vergärbarer Zucker nicht auszunützen, wie es Margaillan[1]) für Glucose und Lactose bewiesen hat. E-Bac. spaltet die Saccharose nicht, dagegen wird die Maltose energisch angegriffen (in 48 Tagen 144,5 mg, d.i. $40^0/_0$); in dieser Zuckerlösung bewahrt er seine Aktivität mehrere Monate.

2. B-Bac. beansprucht außer geeignetem Zucker, und dies namentlich in künstlichen Nährböden, eine Zugabe von kohlensaurem Kalk, der die schädliche Einwirkung der über-

[1]) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **150**, 45, 1910.

schüssigen Säuren neutralisiert und die Kultur noch in anderer Weise kräftig unterstützt, so daß er durch andere Carbonate nicht ersetzbar ist. Weder Magnesium- noch Zinkcarbonat haben so günstig eingewirkt, Calciummonophosphat dagegen hat auch ohne Calciumcarbonat gute Resultate ergeben. Wenn wir erwägen, daß die Milch reich an Kalkverbindungen ist und daß es das einzige Nährsubstrat ist, das auch ohne Kreidezusatz vorzüglich zur Kultur des B-Bac. geeignet ist, kommen wir zu der Überzeugung, daß für diesen Bacillus die Kalkverbindungen unumgänglich notwendig sind.

Hingegen verhält sich E-Bac. gegen Calciumcarbonat indifferent, benötigt seine Gegenwart nicht und gedeiht auch üppig ohne ihn.

3. B-Bac. ist ein fakultativer Anaerobier und zwar in einem Grade, daß übermäßige Luftzufuhr seine Entwicklung zu verhindern vermag. Hiervon habe ich mich sowohl durch Lüften des Nährmediums wie durch Züchtung des Bacillus in dünnen Schichten der Nährlösung überzeugt.

E-Bac. ist entschieden aerob, der in allen Nährmedien sich an der Oberfläche hält und daselbst feste Häutchen bildet.

4. Zu weiteren Differenzen gelangte ich durch das nähere Studium der Produkte, die durch Einwirkung der beiden Bakterien aus der Lactose entstehen. Zu diesem Behufe züchtete ich dieselben parallel im Malzkeimenextrakt, in dem 4 % Lactose, 1 % Pepton unter Zugabe von 3 % gefälltem kohlensauren Kalk gelöst war.

Beide Bakterien erzeugen aus Lactose Milchsäure; die entstandenen Produkte unterscheiden sich aber voneinander durch ihr Verhalten zur Polarisationsebene. B-Bac. erzeugt inaktive Milchsäure, ein Gemisch von links- und rechtsdrehender Komponente in genau gleichen Anteilen; die Menge dieser Säuren, die durch den Bacillus nicht weiter vergärbar ist, entspricht immer genau dem Zuckerverlust. — E-Bac. liefert unter gleichen Verhältnissen rechtsdrehende Milchsäure, deren Menge nur der Hälfte des vergorenen Milchzuckers entspricht; wahrscheinlich geht zuerst der gesamte Zucker in die inaktive Form über, aus welcher der Bacillus später einen optisch aktiven Teil aufbraucht und in der Lösung nur die rechtsdrehende Milchsäure zurückläßt.

Neben der Milchsäure erzeugen beide Bakterien Bernsteinsäure; bei E-Bac. wird 2,6 % Lactose in diese Säure übergeführt, d. h. es wird 10 mal mehr als bei B-Bac. gebildet.

Von flüchtigen Säuren wurde bei beiden Mikroben Essig- und Ameisensäure gefunden, wobei wieder E-Bac. 4 mal mehr, d. i. 12,9 % Zucker, in flüchtige Säuren umwandelte als der B-Bac., der nur 3,2 % Milchzucker in diese Säuren vergor. Wenn wir nun die flüchtigen durch Essigsäure und die nichtflüchtigen Säuren durch Milchsäure zum Ausdrucke bringen, so ist das Verhältnis der flüchtigen zu den nichtflüchtigen Säuren beim B-Bac. 1:31, beim E-Bac. dagegen wie 1:4,35.

5. Ich habe das Verhalten der in der Milch enthaltenen Lactose weiter verfolgt und gefunden, daß in der Milch, wenn keine Kreide zugesetzt wird, eine Zunahme von freien Säuren bis zu einer bestimmten maximalen Acidität stattfindet, die beim B-Bac. 2,6 bis 3 %, beim E-Bac. aber nur 0,5 bis 0,6 % Milchsäure beträgt. In Wirklichkeit aber hört nach Erreichung dieses Maximums die Zersetzung des Zuckers nur beim B-Bac. auf, der bald darauf abstirbt, wogegen E-Bac. den Zucker weiter vergärt. Die Acidität erhöht sich aber nicht, so daß das Verhältnis zwischen vergorenem Zucker und der Gesamtacidität der Lösung dauernd abnimmt. Die Acidität der Milch, die anfangs 75 % des vergorenen Zuckers entsprach, sank nach Verlauf von 4 Wochen auf 20 %. Zur Kontrolle des durch den E-Bac. hervorgerufenen Gärungsvorganges genügt somit nicht die alleinige Bestimmung der Acidität. Diese Abnahme der freien Säuren läßt sich nur durch ihre Neutralisation mit Ammoniak, der durch Zersetzung des Caseins entsteht, und durch die teilweise Vergärung der Milchsäure erklären. Die mit Kreidezusatz angestellten Versuche beweisen auch tatsächlich, daß der Bacillus die weitere Erzeugung von Säuren nicht einstellt, nachdem sich das Verhältnis des vergorenen Zuckers zu den erzeugten Säuren mit dem Alter der Kultur nicht ändert. Die Zuckervergärung geschah unter Einwirkung des E-Bac. stets langsam und unvollkommen, auch die Kreidezugabe half nicht, so daß nach 2 Jahren in der Milch noch ein bedeutender Teil des Zuckers unvergoren verblieb, trotzdem der Bacillus daselbst seine biochemische Aktivität nicht eingebüßt hatte. B-Bac. verhält sich ganz anders; er zersetzt

den Zucker außerordentlich schnell, und wenn der schädliche Einfluß der Milchsäure in der Milch durch Kreidezusatz beseitigt wird, so arbeitet er noch schneller und so lange, bis die ganze Zuckermenge aus der Lösung verschwunden ist.

6. Sämtliche Versuche beweisen das bekannte Faktum, daß B-Bac. eins der allerempfindlichsten Milchbakterien ist, das auch in den allerbesten Nährmedien frühzeitig abstirbt. Zumeist erschöpft ihn sein eigenes Produkt — die Milchsäure — und der Bacillus stirbt in reiner Milch um so früher ab, je rascher das Maximum der Acidität erreicht wird. Im besten Nährboden, d. i. in der Milch, unter Zugabe von Kreide, gelingt es nur selten, den Bacillus länger als 3 Monate am Leben zu erhalten; die alten Kulturen pflegen schon so geschwächt zu sein, daß sie die Koagulation der Milch erst nach einigen Tagen zu bewirken vermögen. — E-Bac. ist dagegen von sehr zäher Natur, der in jeder Nährlösung rasch und gut wächst; seine zwei-, vielleicht auch mehrjährigen Kulturen koagulieren die Milch schon in einigen Stunden.

7. Um mich davon zu überzeugen, ob die Behauptung Effronts, daß der B-Bac. unter bestimmten Bedingungen sich in ein proteolytisches Ferment verwandelt, richtig ist, habe ich die beiden Bakterien bei verschiedenen Temperaturen und in verschiedenen Nährlösungen kultiviert, und zwar: 1. in reiner Milch mit und ohne Kreidezusatz, 2. in Malzkeimenextrakt, der Glucose, Galaktose, Mannose, Lactose, Saccharose oder Maltose nebst Pepton und Kreide enthielt. In mehrtägigen Intervallen wurde die Analyse der Nährlösung durchgeführt, um das Verhalten der beiden Mikroben während des ganzen Gärungsprozesses genau zu verfolgen und namentlich den wichtigen Moment festzustellen, in dem die letzte Spur von Zucker aus der Lösung verschwindet, da nach Effronts Angabe die Umwandlung des B-Bac. in ein proteolytisches Ferment nach 14 Tagen stattfindet. Trotzdem ich weder eine Verflüssigung des Caseins noch eine Bildung sporenenthaltender Häutchen beobachtete, habe ich den B-Bac. noch vor der durchzuführenden Analyse in der Weise kontrolliert, daß ich denselben in eine reine Peptonlösung einerseits und in eine entrahmte, gut sterilisierte Milch andererseits überimpfte. Diese Nährmedien sind am besten dazu geeignet, die Umwandlung

eines Bacillus in den anderen zu prüfen, denn in der Peptonlösung wächst nur der E-Bac., und in der Milch verhalten sich die beiden Bakterien verschiedenartig. Durch B-Bac. wird die Milch gänzlich gefällt und in eine porzellanartige, starre und weiße Masse umgewandelt, die ihr Äußeres nicht ändert. Der E-Bac. dagegen beginnt schon nach einigen Stunden das entstehende Koagulum an der Oberfläche zu verflüssigen, und die Zersetzung des Caseins schreitet dann in den Milchschichten von oben nach unten so lange vor, bis alles vollständig verflüssigt ist. Diese einfache Kontrolle wurde für Lösungen, die durch die Einwirkung des B-Bac. die ganze Zuckermenge verloren haben, durch die Caseinbestimmung ergänzt, um die ev. Zunahme der Proteolyse kontrollieren zu können.

Bei richtig durchgeführter Sterilisierung des Nährmediums habe ich auch nicht in einem einzigen Falle beobachtet, daß der B-Bac. nach Vergärung des ganzen Zuckers auf der Oberfläche der Flüssigkeit Häutchen gebildet hätte, trotzdem ich die Versuche über die 4 bis 6 fache Zeit ausdehnte, die Effront zur Umwandlung des B-Bac. in einen proteolytischen für notwendig erachtet.

B-Bac. bildet, wie schon Cohendy (l. c.) festgestellt hatte, keine Sporen, und so verhielt sich derselbe auch in allen Nährlösungen, in denen ich diesen Bacillus züchtete. Wenn er nach Vergärung des ganzen im Medium vorhandenen Zuckers in die Milch übergeimpft wurde, bewirkte derselbe normale Gerinnung, ohne Casein zu verflüssigen, das immer nur ganz schwach angegriffen wurde, wie schon Bertrand und Weißweiller (l. c.) angegeben haben, so daß nur 5 bis 12 $^0/_0$ dieser stickstoffhaltigen Substanz verloren gingen. Mit den Kulturen der Bakterien, die aus den völlig erschöpften Zuckerlösungen stammten, wurde auch in Peptonlösungen kein Wachstum erzielt, ein Zeichen, daß der Bacillus die Eigenschaften des E-Bac. nicht erworben hat. Es ist völlig ausgeschlossen, daß der ungemein empfindliche Bacillus plötzlich so resistent wird, daß er sich mit Pepton allein begnügen sollte und die Zuckerarten zu zersetzen vermöchte, die er bis zu diesem Moment nicht zu zersetzen imstande war. Noch unwahrscheinlicher scheint der Umstand zu sein, daß der Bacillus diese Eigenschaften gerade in dem Augenblicke erlangt, in dem er am stärksten geschwächt, sämtlicher

Zucker, die Hauptbedingung für seine Existenz, aus der Lösung verschwunden ist, und wo also seine Lebensbedingungen am allerungünstigsten sind. — Schließlich ist es wohl nicht zu bezweifeln, daß ein Bacillus, der auf so leichte Weise ganz neue Eigenschaften annimmt, diese wieder leicht verliert. Sollte E-Bac. also nur eine biochemische Variation des B-Bac. sein, so müßten gewiß Wege vorhanden sein, die umgekehrt vom E-Bac. zum B-Bac. führen. In keinem Falle ließ der E-Bac. von seiner proteolytischen Tätigkeit ab und nahm auch niemals die Eigenschaften des B-Bac. an.

8. Im Verlaufe der Arbeit habe ich zwar einige Fälle festgestellt, wo auch reine Kulturen des B-Bac. sporentragende Häutchen gebildet und die Koagulation der Milch mit nachfolgender Verflüssigung des Caseins wie bei E-Bac. bewirkt haben; die Ursache dieser Erscheinung aber war immer die ungenügende Sterilisierung der Nährlösung. Es ist zur Genüge bekannt, welche Schwierigkeiten zu überwinden sind, um wirklich keimfreie Milch zu erhalten. Besonders schwierig gestaltet sich die Sterilisierung beim Zusatz von kohlensaurem Kalk. Durch eine ganze Reihe von Versuchen habe ich nachgewiesen, daß die Sterilisierung, wie sie Effront durchführte — 20 Minuten bei 1 Atm. Überdruck —, nicht nur für die Milch allein, sondern auch für künstliche Nährböden mit Kreidezusatz vollständig ungenügend ist. Wenn wir nach einer solchen Sterilisierung die Nährlösungen für längere Zeit in einen auf 45° vorgewärmten Thermostaten bringen, bemerken wir, daß ein beträchtlicher Teil nicht steril ist, indem sich auf der Oberfläche der künstlichen Nährböden Häutchen zeigen, die aus sporenbildenden Bakterien zusammengesetzt sind, und in der Milch tritt Koagulation ein, die mit Lösung des Caseins einhergeht. Mir sind häufig Fälle vorgekommen, wo nicht einmal eine 5fache Sterilisierung genügte. Wenn wir nun erwägen, daß diese Befürchtungen auch für die Zubereitung der Medizinalpräparate Geltung haben, so werden wir es begreiflich finden, daß sie auch proteolytische Bakterien enthalten können. Diese fremden Bakterien kommen nicht zur Wirkung, wenn die Kultur frisch ist, das Maximum ihrer Aktivität besitzt, und wenn ausgiebig bei optimaler Temperatur geimpft worden ist. In diesem Falle entwickelt sich B-Bac., die Milch liefert den

typischen Yoghurt, und die hohe Acidität behindert die Entwicklung der fremden Bakterien. Werden aber durch den Kreidezusatz die freien Säuren neutralisiert, so können schließlich fremde Bakterien zur Geltung gelangen, die bei ihrer außerordentlichen Zähigkeit auch in diesem so veränderten, ungünstigen Nährboden auszuhalten vermögen und sich mit den noch nicht angegriffenen Nährstoffen zufriedenstellen. Weil nun die Neutralisation der Säuren, insbesondere im künstlichen Nährboden, leicht zu verlaufen pflegt, so daß die Acidität der Lösung tief unter dem durch den Bacillus erzeugten Maximum liegt, konnte auch Effront leicht aus den oben angeführten Gründen in der Glucoselösung die Häutchen- und Sporenbildung beobachten. In der Milch wurde aber diese Variation von Effront nicht konstatiert. Gewiß bildet hier die hohe Acidität das Hindernis, die das Koagulum über dem kohlensauren Kalk zu halten vermag, und die über dem Maximum steht, das für die Bakterien noch erträglich ist.

Die Ergebnisse der Versuche Effronts werden durch die gegenwärtige Arbeit aufgeklärt. Daß Effront den typischen B-Bac. in den Medizinalpräparaten nicht fand, kann nicht wundernehmen, und dies stimmt vollständig mit den Arbeiten anderer Forscher überein, die diesen Bacillus daselbst auch nicht fanden.

B-Bac. wächst schlecht oder gar nicht in den zur Isolierung üblich verwendeten festen oder flüssigen Nährböden. Nachdem nun seine Vitalität in den Handelspräparaten, insbesondere aber in den trockenen, abgeschwächt, manchmal sogar vollständig lahmgelegt ist, kann somit die Isolierung in diesem Falle sich schwierig durchführbar oder gar zur Unmöglichkeit gestalten. Ist daher das Präparat keine reine Kultur, so unterliegt der abgeschwächte Bacillus entweder den ihm beigemischten fremden Bakterien, die sich in allen Nährmedien entwickeln, oder aber jene Bakterien, die noch nach der ungenügend durchgeführten Sterilisierung in der Milch verblieben sind, tragen den Sieg davon. Es erfolgen häufig Koagulationen, denen später die gänzliche Verflüssigung des Caseins folgt, die gewonnenen Yoghurte sind nicht typisch und leicht durch ihren andersartigen Geschmack erkennbar. Auch E-Bac. liefert keinen typischen Yoghurt, das gewonnene Produkt schmeckt bitter und erreicht bei weitem nicht jenen Wohlgeschmack des echten Yoghurt.

Man kann daher entschieden nicht von einer biochemischen Variation des B-Bac. im Sinne Effronts sprechen; die durch Effront erzielten Resultate beweisen nur, daß die von ihm untersuchten Handelspräparate entweder den typischen Bacillus nicht enthielten, oder aber er war hier in abgeschwächter Form vorhanden, so daß in den Nährmedien, die mit diesem Präparate geimpft wurden, sich entweder die in diesen Präparaten bereits vorhandenen proteolytischen Fermente entwickelten, oder die in den ungenügend sterilisierten Nährlösungen verbliebenen ihre Wirkung entfalteten.

Experimenteller Teil.

Um ein klares Bild von den Eigenschaften der beiden Bakterien zu gewinnen und um festzustellen, ob eines in den anderen überzugehen vermag, kultivierte ich beide Bakterien parallel nicht nur in der Glucoselösung, wo Effront diese Umwandlung beobachtete, sondern auch in der Milch und in einer speziellen Nährlösung in Gegenwart von verschiedenen Zuckerarten. Dieser spezielle Nährboden, den Bertrand und der Verfasser (l. c.) schon früher empfohlen hatten, ist Malzkeimextrakt, das 4 % Zucker, 1 % Pepton und 3 % des gefällten kohlensauren Kalkes enthält. Von den Zuckerarten wurde zumeist Glucose und Lactose, in einigen Fällen auch Galaktose, Mannose, Saccharose und Maltose verwendet. In jeder Versuchsreihe wurden zur Kontrolle auch ungeimpfte Nährlösungen in den Thermostaten bei derselben Temperatur wie die geimpften Lösungen gebracht, und der Versuch wurde nur dann als gültig anerkannt, wenn alle Kontrollösungen steril verblieben. Die Impfung geschah an einem und demselben Tage mit der gleichen Menge einer und derselben, immer 2 tägigen Kultur, die rasch koagulierte; die Lösungen wurden sodann in den Brutschrank bei 30 oder 40° gestellt. — In allen Fällen war schon nach einigen Stunden ein starkes Wachstum bemerkbar, das bei E-Bac. immer stärker und mit der Häutchenbildung an der Oberfläche der Nährlösung verbunden war. Die Analysen der geimpften Lösungen wurden nach mehrtägigen Intervallen durchgeführt. Vor Beginn der Analyse wurde stets eine mikroskopische Untersuchung vorgenommen und mit einer Platinöse die geimpfte Nährlösung in verschiedene

Nährböden übertragen, um festzustellen, ob der Bacillus nicht abgestorben wäre oder ob seine Eigenschaften eine Veränderung erlitten hätten. In den Nährmedien, die den B-Bac. enthielten, wurde das Hauptaugenmerk auf Sporen und Bildung der Häutchen gerichtet, besonders von dem Zeitpunkte an, wo durch die Analyse konstatiert wurde, daß die letzte Spur Zucker in der Lösung vergoren war.

Zur Zuckerbestimmung in den Nährlösungen bediente ich mich der Methode Bertrands[1]). Bei der Milch wurde so verfahren, daß zuvor das Casein durch Quecksilbersulfatlösung gefällt, die Quecksilbersalze durch Zinkpulver abgeschieden und im klaren Filtrat der Zucker bestimmt wurde.

Bei der Caseinbestimmung in der Milch wurde mit Rücksicht auf die Arbeit Bertrand-Weißweiller (l. c.) folgendermaßen vorgegangen: 10 ccm Milch wurden mit genügender Menge 1,5 $^0/_0$ iger Essigsäure gefällt; das durch Zentrifugieren und Dekantieren gewonnene Casein wurde mit Wasser ausgewaschen, mit 96 $^0/_0$ igem Alkohol gemischt, abfiltriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und sodann bei 105^0 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Die Acidität ist durch die Milchsäure ausgedrückt; sie wurde gegen Phenolphthalein mit $^n/_5$-Natronlauge austitriert ohne Rücksicht darauf, daß die Milchsäure teilweise in Ester übergeht, welcher die Acidität erniedrigt. Nur bei ausführlichen Analysen mit einem größeren Volumen der Lösung wurde dieser Umstand berücksichtigt, und die Milchsäure wurde aus dem Ester in Freiheit gesetzt. Bei Gegenwart von kohlensaurem Kalk wurde die Gesamtacidität aus der Menge des zersetzten Carbonats berechnet. Die vollständige Analyse wurde nach der von uns vorgeschlagenen Methode (Bertrand und Verfasser, l. c.) ausgeführt.

Da die Milch und die künstlichen Nährlösungen, die kohlensauren Kalk enthielten, sehr schwer zu sterilisieren sind, wurde der Sterilisierung nach den gewonnenen Erfahrungen besonders große Sorgfalt gewidmet. Zu den Versuchen wurde immer nur 6 bis 8 fach, in 1 bis 2 tägigen Zwischenräumen fraktioniert sterilisierte Milch verwendet; zur Sicherheit wurde die Milch vor ihrer Verwendung in dem auf 45^0 vorgewärmten Thermostaten 7 bis 10 Tage lang aufbewahrt. Wie notwendig diese

[1]) Bull. de la Soc. chim. de Paris 1906.

getroffene Vorsichtsmaßregel war, beweist am besten der Umstand, daß dann noch in einigen Reagensgläsern die Milch gerann und das Gerinnsel, ähnlich wie bei E-Bac., durch Einwirkung der proteolytischen Bakterien, die der Sterilisierung widerstanden, zur Auflösung gebracht wurde. In einigen Fällen habe ich auch die Analyse derartiger Milch unternommen und die gewonnenen Daten, die ich für Zucker, Gesamtacidität, flüchtige und nichtflüchtige Säuren und für Casein erhielt, erinnern sehr an den E-Bac.

Dieselbe Vorsicht wie die Milch erheischen die künstlichen Nährlösungen mit Kreidezusatz, wodurch im hohen Maße die sichere Sterilisierung behindert wird, so zwar, daß manchesmal scheinbar vollständig keimfreie Lösungen nach Einbringung in den Thermostaten sich trüben und mit einer Kahmhaut bedecken. Wenn Effront nur 20 Minuten lange Sterilisierung ohne die vorher erwähnten Vorsichtsmaßregeln durchgeführt hat, so konnte er unmöglich in allen Fällen sterile Nährmedien erhalten. Ich habe mich einige Male selbst überzeugt, daß in einer solchen, nicht genügend sterilisierten Milch weit eher fremde proteolytische Fermente gedeihen als die darin eingeimpfte Kultur des B-Bac.; es erfolgte Koagulation mit nachfolgender Verflüssigung des Caseins wie beim E-Bac. (siehe 30tägige Kultur in Tabelle III). Wenn wir uns aber einer jungen, 2tägigen Kultur bedienen, so wächst der B-Bac. gut und ruft auch in der schlecht sterilisierten Milch normale Koagulation hervor, ohne das Casein aufzulösen, und die durch das Ferment produzierte hohe Acidität verhindert rasch jedwede proteolytische Aktivität anderer Bakterien. Nach einigen Tagen schon ist der B-Bac. aber so abgeschwächt, daß er, in eine sterile Milch übertragen, dortselbst nicht wächst und den proteolytischen Fermenten unterliegt, die neben ihm unangegriffen verblieben. Zu genau denselben Resultaten gelangte ich, als ich nicht genügend sterilisierte Milch, die daher unbekannte Fermente enthielt, durch eine gut sterilisierte ersetzte, in welcher der E-Bac. gezüchtet wurde.

In 20 Reagensgläsern mit sicher vollkommen sterilisierter Milch habe ich ältere Kulturen des E-Bac. überimpft und wie Effront während 20 Minuten bei 1 Atm. Überdruck sterilisiert. Die Reagensgläser teilte ich hierauf in zwei Gruppen, wovon die eine ungeimpft verblieb, die andere mit einer sehr aktiven

Reinkultur von B-Bac. geimpft wurde. Nach einem 7 tägigen Aufenthalt im Brutschrank bei 40° wurde festgestellt:

1. Von 10 ungeimpften verblieben 7 Reagensgläser steril, und in 3 war das Wachstum des E-Bac. bemerkbar.

2. Die geimpften Reagensgläser ergaben in allen Fällen normalen Yoghurt; nach 10 Tagen war aber der B-Bac. im Yoghurt so abgeschwächt, daß er nach Übertragung in eine frisch sterilisierte Milch in zwei Fällen vom E-Bac. überholt wurde.

Dieser einfache Versuch zeigt, wie zähe der E-Bac. ist, daß er nicht nur die Sterilisierung, sondern auch die ungünstigen Bedingungen, die durch die junge Kultur des B-Bac. hervorgerufen werden, zu vertragen vermag.

Wird der E-Bac. in den fertigen Yoghurt gebracht, so vermag er sich daselbst nicht zu behaupten, auch wenn eine junge Kultur des B-Bac. eingeimpft worden war; erst nach Übertragung dieser Kultur nach einigen Tagen in eine neue Milch siegt der E-Bac. über den abgeschwächten B-Bac.

Wenn gleichzeitig beide Bakterien in die Milch überimpft werden, ist das Resultat keineswegs immer konstant; regelmäßig aber behauptet sich die junge Kultur des B-Bac., und erst, wenn sie in neue Milch übertragen wird, ist der E-Bac. der stärkere.

1. Einwirkung der Bacillen auf Milch.

Zur Benutzung gelangte zentrifugierte Milch, die 4,86 % Lactose und 2,86 % Casein enthielt. Die Acidität der Milch wurde bestimmt, als Milchsäure ausgedrückt und von der Menge der durch den Bacillus gebildeten Acidität in Abzug gebracht, so daß auf der Tabelle der Zuwachs der Acidität direkt aufgeführt ist. Die Daten für Lactose-Prozente und für die Ausbeute sind auf ganze Zahlen abgerundet.

Ein Überimpfen in reine Milch ging jeder Analyse voraus, und die beobachtete Veränderung ist in der letzten Kolonne (Tabelle I und II) verzeichnet. Die normale Koagulation ist mit +, der negative Ausfall derselben mit 0 gekennzeichnet.

In der Milch (Tabelle I) erreicht schon nach den ersten 4 bis 9 Tagen, je nach der Temperatur, die durch den B-Bac. erzeugte Acidität ihr Maximum bei 2,3 bis 2,6 % Milchsäure. Die steigenden Mengen der Milchsäure erschöpften den Bacillus und töten ihn bald ab. Die Gesamtacidität entspricht jedes-

mal der Menge des vergorenen Zuckers, so daß die Ausbeute in der Milchsäure stets 100 % beträgt. Die hier beobachtete unbedeutende Differenz ist auf Kosten der anderen Säuren (Essig-, Ameisen- und Bernsteinsäure) zu stellen, die als Ergebnis der Lebensprozesse des Protoplasmas zu betrachten sind.

Tabelle I.

Einwirkung des B-Bac. auf Milch.
Für 100 g Milch.

Alter der Kultur in Tagen	Casein gelöst		Milchzucker vergoren		Milchsäure		Koagulat. der Milch
	mg	%	mg	%	gefunden mg	aus 100 Teil. Zucker gebildet	
a) Temperatur 30°.							
2	86	3	—	—	—	—	+
5	—	—	1958	40	2115	108	+
8	257	9	2079	43	2232	112	+
10	—	—	2126	44	2313	109	+
15	289	10	2063	42	2196	106	0
19	—	—	2042	42	2277	111	0
24	320	11	2042	42	2313	113	0
37	—	—	2126	44	2313	109	0
92	—	—	2084	43	2306	111	0
138	—	—	2150	44	2313	107	0
b) Temperatur 40°							
4	—	—	2209	45	2430	110	+
9	—	—	2361	49	2502	106	0
16	—	—	2261	47	2465	109	0

Tabelle II.

Einwirkung des E-Bac. auf Milch.
Für 100 g Milch. Temperatur 30°.

Alter der Kultur in Tagen	Casein gelöst		Lactose vergoren		Milchsäure		Koagulat. der Milch
	mg	%	mg	%	gefunden mg	aus 100 Teil. Zucker gebildet	
1	1750	61	—	—	—	—	+
3	—	—	483	10	360	75	+
7	1990	69	777	16	504	65	+
12	—	—	1218	25	504	41	+
16	1450	51	1444	30	585	40	+
27	—	—	2667	55	504	19	+
40	2630	92	1759	36	693	39	+
138	—	—	2932	60	756	26	+

Eine Umwandlung des B-Bac. in den anderen wurde hier nicht einmal nach 138 Tagen beobachtet; anfangs verursachte der Bacillus normale Gerinnung, späterhin aber stellte sich überhaupt keine ein.

Ganz anders verhält sich der E-Bac. (Tabelle II) in der

Milch. Die Lactose wird viel langsamer vergoren, so daß nach 5 Monaten fast noch 50% Lactose in der Lösung gefunden wurden. Das Maximum der Acidität wird viel früher erreicht, schon bei 0,5%, und ändert sich dann fast gar nicht. Anfangs, wo der Bacillus noch nicht das Casein angreift, entspricht die Gesamtacidität 75% des vergorenen Zuckers, mit dem Alter der Kultur aber sinkt das Verhältnis bis auf 20%; von diesem Augenblicke an, von dem der Bacillus mit der Zersetzung des Caseins beginnt, gewinnt derselbe hiermit Ammoniak zur Neutralisation der sich entwickelnden Säuren und erniedrigt selbst die Acidität der Lösung. Sonst aber erleiden die Eigenschaften des Bacillus keine Veränderung, so daß nach 138 Tagen derselbe noch die neue Milch in einigen Stunden in normaler Weise zum Gerinnen brachte.

2. Einwirkung der Bakterien auf Milch mit Kreidezusatz.

Auch hier wurde entrahmte Milch mit 4,86% Lactose benutzt. In der Mehrzahl der Fälle wurde nur die Acidität der Milch bestimmt, die oberhalb der Kreide gelegen ist, in einigen Fällen wurde durch Titration der Verlust an kohlensaurem Kalk bestimmt und auf Milchsäure umgerechnet.

Vor Durchführung der Analyse wurde immer der Bacillus nicht nur in die Milch, sondern auch in die Peptonlösung überimpft und diese Kulturen makro- und mikroskopisch untersucht; von dem Momente an, wo sämtlicher Zucker aus der Milch verschwand, wurde überdies in der zur Kontrolle dienenden Milch die Acidität und Casein bestimmt, um zu konstatieren, ob die Grundeigenschaften der Bakterien keine Veränderung erlitten hatten.

Die Versuche zeigen, daß B-Bac. (Tabelle III) den Milchzucker in Gegenwart von $CaCO_3$ viel rascher und vollständiger zersetzt; der Bacillus führt schon nach 10 Tagen sämtliche Lactose in Milchsäure über, gegen die derselbe durch die Anwesenheit des $CaCO_3$ in dem Maße geschützt ist, daß er in diesem zuckerfreien Medium noch 3 bis 4 Monate lebt. Mit zunehmendem Alter tritt beim Überimpfen in die Milch die Koagulation immer später ein, bis schließlich eine 5 Monate alte Kultur überhaupt nicht mehr koaguliert.

Das Aussehen des mit diesen Kulturen gewonnenen Yoghurt war stets ein normales, mit einer einzigen Ausnahme (mit 30tägi-

ger Kultur in der Tabelle III), wo eine Zersetzung des Caseins beobachtet wurde; die Ursache hiervon war aber die ungenügende Sterilisierung dieser Versuchsserie. In keinem Falle, nicht einmal bei den älteren Versuchen, wurde die für den E-Bac. so charakteristische Bildung von Häutchen beobachtet, und in neuer Milch ist immer normale Koagulation ohne Caseinzersetzung eingetreten, wobei die Daten für Acidität und Caseinverlust konstant waren und den am Pasteurschen Institute in Paris durch Bertrand und Weißweiller (l. c.) vorgenommenen Versuchen entsprachen. Ebenso wurde auch das Wachstum des B-Bac. in einer Peptonlösung nie beobachtet.

Tabelle III.

Einwirkung des B-Bac. auf Milch mit Kreidezusatz.
Für 100 g Milch. Temperatur 30°.

Alter der Kultur in Tagen	Lactose vergoren		Milchsäure		Wachstum in der Peptonlösung	Nach Übertragung in die Milch		
	mg	%	gefunden mg	aus 100 Teil. Zucker gebildet		Koagulation	Acidität in mg Milchsäure ausgedrückt	% Casein zerlegt
							nach 5 bis 7 Tagen	
5	3350	69	(1809)[1]	—	0	+	2313	9
8	4370	90	(1535)	—	0	+	2170	9
10	4606	95	(1350)	—	0	+	—	—
15	4861	100	(963)	—	0	+	2210	10
19	4861	100	(882)	—	0	+	2011	8
24	4861	100	—	—	0	+	1450	7
30	4861	100	—	—	0	[2]	—	—
40	4861	100	—	—	0	+	1625	8
92	4861	100	—	—	0	+	562	5
139	4861	100	5298	109	0	+	—	—

Beim E-Bac. konnte kein besonderer Vorteil des $CaCO_3$-Zusatzes festgestellt werden; die Zersetzung der Lactose verläuft gleichartig, ob mit oder ohne $CaCO_3$, immer langsam und unvollständig. Eine 2 Jahre alte Milchkultur war schon vollkommen klar, gelb, sämtliches Casein war zersetzt, aber trotzdem waren noch 62% Zucker unvergoren. Aber auch dieser Bacillus ändert sonst nicht seine Eigenschaften, verbleibt weiter ein proteolytisches Ferment, und seine, auch mehrjährigen,

[1]) Daten in Klammern geben die Acidität der Milch oberhalb des kohlensauren Kalkes an.

[2]) Koagulation mit nachfolgender Verflüssigung des Caseins; die Ursache war eine unvollkommene Sterilisierung dieser Kontrollmilch.

Kulturen koagulieren die Milch rasch und wachsen in der Peptonlösung ganz vorzüglich.

3. Einwirkung der Bacillen auf Lactoselösungen.

Zur parallelen Kultivierung der beiden Bakterien wurde eine 4 %ige Milchzuckerlösung im Malzkeimextrakte unter Zusatz von 1 % Pepton und 3 % gefällten $CaCO_3$ verwendet. Interessant ist, daß die künstlichen Nährböden, die für B-Bac. bestimmt sind, einen Zusatz von $CaCO_3$ unbedingt erhalten müssen, wogegen die Milch dieses Zusatzes nicht bedarf. Wenn wir erwägen, daß der Bacillus imstande ist, in der Milch bis 3 % Milchsäure zu erzeugen und zu vertragen, so können wir behaupten, daß hier nicht einmal so sehr die Gegenwart der Carbonate als wie die Gegenwart der Kalksalze im allgemeinen maßgebend ist. Daß dem so ist, beweist der Umstand, daß der Bacillus wirklich im Nährmedium, das anstatt $CaCO_3$ andere Carbonate, wie z. B. Magnesium- oder Zinkcarbonat, enthielten, sich nicht entwickelte, und erst durch gleichzeitigen Zusatz von Kalksalzen (Phosphat, Sulfat) wurde der Nährboden in dem Maße verbessert, daß man ein üppiges Wachstum erzielte. Zugunsten dieser Anschauung spricht auch die Tatsache, daß für den B-Bac. die Milch das beste Medium ist, die eben an Kalksalzen (Phosphat, Caseinat) reich ist; selbstverständlich

Tabelle IV.

Einwirkung des E-Bac. auf Milch mit Kreidezusatz.
Für 100 g Milch. Temperatur 30°.

Alter der Kultur in Tagen	Lactose vergoren		Milchsäure		Wachstum in der Peptonlösung	Nach Übertragung in die Milch		
	mg	%	gefunden mg	aus 100 Teil. Zucker gebildet		Koagulation	Acidität in mg Milchsäure ausgedrückt (nach 5 bis 7 Tagen)	% Casein zerlegt (nach 5 bis 7 Tagen)
3	784	16	—	—	+	+	524	69
7	1407	29	(504)[1])	—	+	+	502	61
12	1675	34	(423)	—	+	+	—	—
16	1860	38	(423)	—	+	+	540	65
27	2147	44	(540)	—	+	+	—	—
40	2630	54	(387)	—	+	+	—	—
138	2636	54	1665	63	+	+	420	58
2 Jahre[2])	1867	38	—	—	+	+	—	—

[1]) Daten in Klammern geben die Acidität der Milch oberhalb des kohlensauren Kalkes an.

[2]) Die Kultur wurde in einer zugeschmolzenen Röhre aufbewahrt.

unterstützen das Casein und die neutralen Phosphate die Kultur auch dadurch, daß sie einen kleinen Teil der sich entwickelnden Säuren sättigen.

In 100 g Nährlösung wurden in den Kontrollversuchen 4,09 g Lactose gefunden. Von dieser Menge entfielen 0,313 g auf den reduzierenden Zucker, der schon in dem Malzkeimextrakt enthalten ist. Dabei ist der Umstand interessant, daß dieser Zucker nur unter bestimmten Bedingungen vergärbar ist; der B-Bac. vergärt denselben nur in Anwesenheit der Lactose (Tabelle IV), wogegen in der Glucoselösung der Zucker des Malzkeimextraktes unangegriffen bleibt (Tabelle VII).

Tabelle V.

Einwirkung des B-Bac. auf Lactoselösung.
Für 100 g Lösung.

Alter der Kultur in Tagen	Lactose vergoren		Wachstum in der Peptonlösung	Nach Übertragung in die Milch		
	mg	%		Koagulation	Acidität in mg Milchsäure ausgedrückt	% Casein zerlegt
					nach 5 bis 7 Tagen	
a) Temperatur 30°						
5	1118	30	0	+	2408	10
8	1990	53	0	+	2030	8
10	1118	30	0	0	0	0
24	2930	78	0	+	862	6
33	3040	80	0	[2])	—	—
35	4090	100 [1])	0	0	0	0
60	4090	100	0	0	0	0
90	4090	100	0	0	0	0
b) Temperatur 40°						
9	3354	82	0	+	—	—
14	4090	100	0	+	2002	8
30	4090	100	0	0	—	—
72	4090	100	0	0	—	—

Wenn wir nun die vorgenommenen Versuche im künstlichen Nährmedium mit den vorher angeführten vergleichen, sehen wir, daß der B-Bac. die Zersetzung der Lactose nicht so rasch durch führt wie in der Milch mit $CaCO_3$-Zusatz, und daß er hier bald eingeht, wogegen für den E-Bac. die künstliche Nährlösung mit Lactose sehr vorteilhaft erscheint, ja so-

[1]) Koagulation mit nachfolgender Verflüssigung des Caseins; die Ursache war unvollkommene Sterilisierung.

[2]) Die Gesamtacidität, in Milchsäure ausgedrückt, war 4256 mg, d. i. 104 Teile Säure wurden aus 100 Teilen Zucker gebildet.

gar ebenso gut ist wie die Milch. Sonst wurde das Verhältnis zwischen vergorenem Zucker und der daraus gebildeten Milchsäure gar nicht tangiert. In keinem einzigen Falle wurde beim B-Bac. Häutchen- und Sporenbildung beobachtet, trotzdem die Lösungen nach dem gänzlichen Verschwinden des Zuckers noch 2 Monate weiter der Beobachtung unterzogen wurden. Bei Übertragung aus dem künstlichen Nährmedium in die Milch koagulierte der B-Bac. normal, erzeugte viel Säure und verflüssigte nur eine minimale Menge Casein. Nach vollständigem Aufbrauchen des Zuckers stirbt der Bacillus bald ab, und in der Milch stellt sich keine Koagulation ein. In der Peptonlösung wurde niemals beim B-Bac., der künstlichen, Lactose enthaltenden Nährlösungen entnommen wurde, ein Wachstum erzielt. B-Bac. behält daher seine Eigenschaften, seine Umwandlung in ein proteolytisches Ferment geht nicht vor sich, wenn auch die Versuchsbedingungen Effronts strikt eingehalten wurden. Ebenso verhielt sich auch der E-Bac. (Tabelle VI) ohne Unterschied des Alters immer gleich: er wuchs in der Peptonlösung, und nach der Koagulation wurde das Milchcasein energisch angegriffen.

Tabelle VI.

Einwirkung des E-Bac. auf die Lactoselösung.
Für 100 g Lösung. Temperatur 30°.

Alter der Kultur in Tagen	Lactose vergoren		Wachstum in der Peptonlösung	Nach Übertragung in die Milch		
	mg	%		Koagulation	Acidität in mg Milchsäure ausgedrückt (nach 5 bis 7 Tagen)	% Casein zerlegt (nach 5 bis 7 Tagen)
3	567	15	+	+	—	—
7	1391	37	+	+	483	72
12	1102	29	+	+	—	—
34	2830	75[1]	+	+	562	67
36	2694	71[2]	+	+	—	—
40	3470	92	+	+	528	63

Besonders interessant gestalten sich die Ergebnisse der Versuche, die mit 600 ccm ähnlich zusammengesetzter Lösung angestellt wurden, die 24,54 g Lactose, davon 1,878 g reduzierender Substanz, enthielt. Damit die Oberfläche der Lösung

[1]) Milchsäure gefunden 2114 mg, d. i. Ausbeute 75%.
[2]) „ „ 1782 mg, „ „ „ 66%.

so wenig als möglich mit der Luft in Berührung käme, wurden namentlich beim B-Bac. die Versuchskolben bis zum Halse mit Lösung gefüllt. Ich habe übereinstimmend mit Cohendy (l. c.) estgestellt, daß B-Bac. fakultativ anaerob ist, der vorwiegend Neigung zur Anaerobiose zeigt, wogegen beim E-Bac. die Häutchenbildung auf Vorliebe für Aerobiose hinweist. Wird der B-Bac. in hohen Schichten der Nährlösungen mit kleiner Oberfläche kultiviert, so wächst er immer gut; wird jedoch durch die Lösung sterile Luft geleitet, oder wird der Bacillus nur in dünnen Schichten der Flüssigkeit mit großer Oberfläche gezüchtet, so wird die Kultur schwach oder wächst überhaupt nicht. Ist Milch das Nährmedium, so stellt sich die Koagulation später ein. Eine in dieser Weise getroffene Anordnung des Versuches ist für die Kultur des B-Bac. schädlich, hingegen für den E-Bac. aber vorteilhaft.

Die Analyse der Lösungen wurde beim B-Bac. nach 33 und beim E-Bac. nach 34 Tagen durchgeführt. Zur Analyse wurde folgende Methode in Anwendung gebracht:

Nach der Filtration wurde, wie bei allen anderen Versuchen, im Niederschlage die Menge des zurückgebliebenen $CaCO_3$ durch Titration mit n-HCl bestimmt und der Verlust auf Milchsäure umgerechnet; an gebundener Milchsäure wurden gefunden:

B-Bac. . . . . . 24,138 g,
E-Bac. . . . . . 11,529 g.

Nach Zurechnung der Acidität des Filtrates, die ebenfalls in Milchsäure ausgedrückt wurde (beim B-Bac. 1,386 g, beim E-Bac. 1,156 g), sind im ganzen:

B-Bac. . . . . . 25,524 g,
E-Bac. . . . . . 12,685 g

freier und gebundener Säuren, in Milchsäure ausgedrückt, vorhanden.

Nach Abrechnung der sonstigen nichtflüchtigen und flüchtigen Säuren verbleibt auf Milchsäure:

B-Bac. . . . . . 24,300 g,
E-Bac. . . . . . 9,068 g,

d. i. 99 % Zucker beim B-Bac. und 53,4 % Zucker beim E-Bac. wurden in Milchsäure vergoren.

Im Filtrat wurde Zucker nach der Bertrandschen Methode bestimmt und gefunden:

B-Bac. . . . . . . 0,00 g,
E-Bac. . . . . . . 7,56 g,

somit vergoren:

B-Bac. . . . . . . 100 %,
E-Bac. . . . . . . 69 % Zucker.

Im Filtrat wurden die gelösten Kalksalze quantitativ mittels Oxalsäure gefällt und das neue Filtrat im Vakuum bis zur Sirupkonsistenz eingedampft; das Destillat, das die flüchtigen Produkte enthielt, wurde mit Barytwasser titriert. Wenn wir die Daten auf Essigsäure umrechnen, so erhalten wir:

B-Bac. . . 0,785 g (d. i. ca. 3 % der Gesamtacidität),
E-Bac. . . 2,188 g (d. i. ca. 17 % „ „);

somit wurden 3,2 % Zucker beim B-Bac., 12,9 % Zucker beim E-Bac. in Essigsäure vergoren.

Es ist daher das Verhältnis der flüchtigen zu den nichtflüchtigen Säuren durch 1 : 31 für B-Bac. und durch 1 : 4,35 für E-Bac. ausgedrückt.

Der nach dem Eindampfen der flüchtigen Säuren resultierende, stark saure und die nichtflüchtigen Produkte enthaltende Sirup wurde mit Äther extrahiert, der ätherische Extrakt verdampft, der restliche Sirup in Wasser gelöst und mit Barytwasser neutralisiert. Das überschüssige Bariumhydrat wurde mit Kohlensäure abgeschieden, durch Kochen im Vakuum wurde die überschüssige Kohlensäure entfernt und das Bariumbicarbonat zerlegt, das Präcipitat durch Filtration entfernt, und das im Filtrat enthaltene Bariumsalz wurde mittels Zinksulfat in Zinklactat übergeführt; das klare Filtrat gab nach Eindampfen im Vakuum den ersten und nach Abdampfen der Mutterlauge den zweiten Anteil der Zinklactatkrystalle. Es wurden gefunden:

	B-Bac.	E-Bac.
I. Krystalle . . .	18,7350 g	1,817 g
II. „ . . .	2,5438 g	1,100 g
Im ganzen Zinklactat	21,2788 g	2,917 g

Einzelne Anteile des Zinklactats wurden bei einer Temperatur von 30° getrocknet, durch weitere Erhöhung der Temperatur auf 110° wurde das Krystallwasser, durch Calcination das Zinkoxyd und $[\alpha]_D$ der 2 %igen Lösung in 50 cm langer Röhre bestimmt. Es wurde gefunden:

		B-Bac.	E-Bac.
I. Krystalle	H_2O	18,0 %	12,92 %
	ZnO	28,0 %	29,40 %
	$[\alpha]_D$	$\pm 0^0$	$-7,27^0$ [1]
II. Krystalle	H_2O	18,04 %	11,4 %
	ZnO	28,12 %	30,8 %
	$[\alpha]_D$	$\pm 0^0$	$-7,77^0$ [1]

Die mit B-Bac. gewonnenen Daten stimmen vollständig überein mit der Zusammensetzung des racemischen Zinklactats $(C_3H_5O_3)_2Zn + 3H_2O$, das 18,18 % H_2O, 27,27 % ZnO enthält und $[\alpha]_D = \pm 0^0$ hat, wogegen die Daten für E-Bac. vollständig entsprechen dem l-Lactat $(C_3H_5O_3)_2Zn + 2H_2O$, das 12,89 % H_2O, 29,03 % ZnO enthält und $[\alpha]_D = -9^0$ hat.

Aus den Mutterlaugen vom Zinklactat wurde die Bernsteinsäure nach vorangegangener Ansäuerung mit Schwefelsäure mit Äther extrahiert. Nach dem Abtreiben des Äthers krystallisierte aus dem restlichen Sirup die Bernsteinsäure, die sodann aus dem Wasser noch umkrystallisiert wurde. An Bernsteinsäure wurden gewonnen:

B-Bac. . . . . . 0,063 g,
E-Bac. . . . . . 0,440 g,

d. i. 0,26 resp. 2,59 % Zucker wurden in Bernsteinsäure übergeführt.

Die Reinheit der Krystalle wurde auf dem Maquenneblock durch den Schmelzpunkt (187 bis 188°) und durch alkalimetrische Bestimmung des Molekulargewichtes (118) kontrolliert; beim Erhitzen der Krystalle bildete sich ein weißer Rauch von ungemein stechendem Geruch; ihre neutrale Lösung ergab mit Eisenchlorid den charakteristischen roten Niederschlag des Ferrisuccinats.

Die Unterschiede zwischen beiden Bacillen sind hier sehr auffallend. Der B-Bac. vergärt in gleicher Zeit weit größere Mengen Lactose als der E-Bac. Die ganze Lactose wird vom B-Bac. in Milchsäure übergeführt, d. h. die Ausbeute an dieser Säure ist 100 %ig, und nur etwa 5 % der Gesamtacidität entfallen auf andere Säuren; E-Bac. hingegen benutzt nur 72 %

[1]) Das Drehungsvermögen schwankt mit der Konzentration (Jungfleisch und Godchot, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. **140**, 719).

des Zuckers zur Bildung von Säuren, hauptsächlich der Milchsäure, und auf die anderen Säuren kommen 30 % der Gesamtacidität. Der allerwesentlichste Unterschied ist aber das Drehungsvermögen der erzeugten Milchsäure; während der B-Bac. eine nichtaktive Säure liefert, erzeugt der E-Bac. unter gleichen Bedingungen eine rechtsdrehende Milchsäure. Es scheint, daß beide Bacillen zunächst aus dem Zucker eine racemische Milchsäure bilden, d. h. ein Gemisch von Molekularmengen zweier gleich stark, aber entgegengesetzt drehender Säuren, die der B-Bac. weiter nicht attackiert, wogegen der E-Bac. die linksdrehende Säure vollständig aufzehrt und die zweite, konträre Form, die genau der Hälfte des vergorenen Zuckers entspricht, unangegriffen läßt.

Neben der Milchsäure entwickeln beide Bakterien auch die Bernsteinsäure, E-Bac. 10 mal so viel als B-Bac. Ebenso werden die flüchtigen Säuren in größerer Menge vom E-Bac. erzeugt, und zwar 4 mal mehr als vom B-Bac.

4. Einwirkung der Bacillen auf Glucose-, Galaktose- und Mannoselösungen.

Auch hier wurden dieselben Nährlösungen benützt wie in den vorhergehenden Versuchen, nur wurde die Lactose durch Glucose, Galaktose oder Mannose ersetzt, die laut Kontrollversuchen in Mengen von 4,235 resp. 3,980 resp. 4,098 enthalten waren. Von diesen entfallen 0,208 g auf die im Malzkeimextrakte enthaltene reduzierende Substanz.

Die Glucose (Tabelle VII und VIII) wird von beiden Bacillen sehr energisch zersetzt, besonders aber durch den B-Bac. In beiden Fällen aber verbleibt die kleine Menge der reduzierenden, im Malzkeimextrakte enthaltene Substanz unvergoren. Die Glucoselösungen sind für beide Bakterien sehr günstige Nährmedien und fast so gut wie die Milch mit Kreidezusatz. Auch die Glucose wird vom B-Bac. vollständig in Milchsäure übergeführt, wogegen die durch E-Bac. verursachte Gesamtacidität nur 71 % der vergorenen Glucose entspricht, also ähnlich wie bei der Lactose.

Weder bei der Glucose (Tabelle VII und VIII), noch bei der Galaktose (Tabelle IX), noch bei der Mannose (Tabelle X), überhaupt bei keiner der verwendeten Zuckerarten konnte

man eine Umwandlung des B-Bac. in den E-Bac. feststellen; bei allen Kulturen, in denen bereits Zucker vergoren war, wurde beim B-Bac. keine Häutchenbildung beobachtet, und wenn sich neue Milch durch diese Kultur koagulieren ließ, so verhielt

Tabelle VII.

Einwirkung des B-Bac. auf Glucoselösung.
Für 100 g Lösung.

Alter der Kultur in Tagen	Glucose vergoren		Acidität der Lösung oberhalb des $CaCO_3$ in mg Milchsäure	Wachstum in der Peptonlösung	Nach Übertragung in die Milch		
	mg	%			Koagulation	Acidität in mg Milchsäure ausgedrückt (nach 5 bis 7 Tagen)	% Casein zerlegt (nach 5 bis 7 Tagen)
			a) Temperatur 30°.				
5	2970	74	—	0	+	—	—
8	3910	97	(891)	0	+	2108	9
10	2115	53	(891)	0	+	—	—
15	3675	91	—	0	+	2315	10
19	4027	100	(198)	0	+	1890	6
24	4027	100	(198)	0	+	2221	8
29	—	—	—	0	+	1020	5
92	4027	100	(81)	0	0	—	—
140	4027	100	—	0	0	—	—
			b) Temperatur 40°.				
2	3061	76	—	0	+	—	—
3	3946	98	—	0	+	—	9
5	4027	100	—	0	+	2110	6
30	4027	100	—	0	+	1440	5
90	4027	100	—	0	0	—	—

Tabelle VIII.

Einwirkung des E-Bac. auf Glucoselösung.
Für 100 g Lösung. Temperatur 30°.

Alter der Kultur in Tagen	Glucose vergoren		Acidität der Lösung oberhalb des $CaCO_3$ in mg Milchsäure	Wachstum in der Peptonlösung	Nach Übertragung in die Milch		
	mg	%			Koagulation	Acidität in mg Milchsäure ausgedrückt (nach 5 bis 7 Tagen)	% Casein zerlegt (nach 5 bis 7 Tagen)
3	591	15	—	+	+	620	69
7	1055	26	(270)	+	+	—	—
12	1875	47	(270)	+	+	—	—
16	2570	64	(198)	+	+	—	—
40	4027	100	—[1]	+	+	504	63
143	4010	100	—	+	+	542	65

[1]) Milchsäure gefunden 2871 mg, d. i. Ausbeute 71 %.

Tabelle IX.

Einwirkung des B-Bac. auf Galaktoselösung.
Für 100 g Lösung. Temperatur 40°.

Alter der Kultur in Tagen	Galaktose vergoren		Wachstum in der Peptonlösung	Nach Übertragung in die Milch		
	mg	%		Koagulation	Acidität in mg Milchsäure ausgedrückt	% Casein zerlegt
					nach 5 bis 7 Tagen	
2	1358	36	0	+	2461	9
5	2339	62	0	+	2406	11
14	3772	100	0	+	—	—
21	3772	100	0	+	2308	8
42	3772	100	0	+	—	5
96	3772	100	0	0	—	—
121	3772	100	0	0	—	—

Tabelle X.

Einwirkung des B-Bac. auf Mannoselösung.
Für 100 g Lösung. Temperatur 40°.

Alter der Kultur in Tagen	Mannose vergoren		Wachstum in der Peptonlösung	Nach Übertragung in die Milch		
	mg	%		Koagulation	Acidität in mg Milchsäure ausgedrückt	% Casein zerlegt
					nach 5 bis 7 Tagen	
4	2150	56	0	+	—	—
9	806	21	0	+	—	—
12	3840	100	0	+	2020	7
26	3840	100	0	+	2243	6
60	3840	100	0	0	—	—
74	3840	100	0	0	—	—
116	3840	100	0	0	—	—

sich der Bacillus niemals wie E-Bac., sondern es wurden höchstens nur 10% der gesamten Caseinmenge zur Lösung gebracht. Der B-Bac. wuchs auch nie in reiner Peptonlösung. Die Eigenschaften des E-Bac. erlitten nicht einmal nach 20 Wochen eine Einbuße, er gedieh immer sehr gut in der reinen Peptonlösung, bildete an der Oberfläche der Lösungen sporentragende Häutchen und ergab in der Milch stets normale Koagulation mit darauf folgender schneller Verflüssigung des Caseins.

Eine Methode zur quantitativen Milchsäurebestimmung im Harne.

Von

J. Schneyer (Bad Gastein).

(Aus dem Laboratorium der Ludwig-Spiegler-Stiftung in Wien.)

(Eingegangen am 18. April 1915.)

Im folgenden wird über eine sehr genaue Methode zur quantitativen Milchsäurebestimmung im Harne berichtet, nach der Milchsäure als Kohlenoxyd gemessen wird. Der erste, der darauf aufmerksam gemacht hat, daß Milchsäure und milchsaure Salze, mit dem 5- bis 6fachen Gewichte Schwefelsäure versetzt, bei gelindem Erwärmen Kohlenoxyd entwickeln, war Pelouze[1]). Diese Beobachtung gab Hübner Veranlassung, eine Methode auszuarbeiten, die Milchsäure quantitativ als CO zu bestimmen. Er fand bei seinen diesbezüglichen Arbeiten, daß nicht verdünnte, wohl aber konzentrierte Schwefelsäure Milchsäure quantitativ zu Kohlenoxyd zersetzt.

Die Formel, nach der diese Zersetzung vor sich geht, ist folgende:

$$C_3H_6O_3 = C_2H_4O + H_2O + CO.$$

Ein Molekül Milchsäure entspricht demnach einem Molekül Kohlenoxyd.

R. Meissner hat dieses Grundprinzip zur Ausarbeitung einer schönen und genauen Methode benutzt, die Milchsäure quantitativ in Blut und Geweben zu bestimmen.

Diese Methode Meissners schien mir sehr geeignet, für die Milchsäurebestimmung im Harne modifiziert, bzw. ergänzt zu werden. Es war von vornherein anzunehmen, daß im Harne, der in chemischer Zusammensetzung von der Blutflüssig-

---

[1]) Die Literatur siehe: R. Meissner, Über die quantitative Bestimmung der Milchsäure in Organextrakten. Diese Zeitschr. 68, 175, 1915.

keit und den Geweben so sehr differiert, Substanzen enthalten sein werden, die Fehlerquellen bei der Abspaltung des CO liefern. Da nach Meissner ein Ätherauszug der Milchsäure verwendet wird, so mußten ja diejenigen Substanzen aus dem Harne entfernt werden, die in den Äther übergehen und nach ihrer chemischen Konstitution unter der Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure Kohlenoxyd liefern könnten. Aus normalem bzw. pathologischem Harne können von Substanzen, die hier in Betracht kommen, übergehen: Oxalsäure, Hippursäure, Benzoesäure, Oxybuttersäure, Essigsäure, Acetessigsäure und Fettsäuren. Ich habe deshalb in Vorversuchen jede einzelne dieser Substanzen daraufhin untersucht, ob sie unter der Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure bei gelindem und starkem Erwärmen Kohlenoxyd abspaltet. Das Ergebnis dieser Vorversuche war nun folgendes:

1. Hippursäure und Benzoesäure entwickeln gar kein Kohlenoxyd, ebensowenig die Essigsäure.

2. Oxybuttersäure und Fettsäuren entwickeln CO in so geringen Mengen, daß sie als Fehlerquelle vernachlässigt werden können.

3. Oxalsäure und Acetessigsäure hingegen entwickeln reichlich Kohlenoxyd und können wohl das Resultat der Milchsäurebestimmung als Kohlenoxyd fehlerhaft beeinflussen.

Deshalb müssen bei der Bestimmung von Milchsäure als CO im Harne, der eine oder beide dieser Substanzen enthält, vor allem diese Substanzen eliminiert werden. Die Oxalsäure wird dadurch entfernt, daß man sie als Calciumoxalat niederschlägt und von diesem abfiltriert. Zu diesem Zwecke wird der Harn mit kleinen Mengen (1 bis 2 ccm) kalt gesättigter Chlorcalciumlösung und darauf etwas Ammoniak versetzt, und es wird vom entstehenden Niederschlag von oxalsaurem Calcium abfiltriert. Die Acetessigsäure, die sehr leicht spaltbar und flüchtig ist, zersetzt sich schon, wenn man den sauren Harn einige Zeit kocht unter Abspaltung des flüchtigen Acetons.

Die Methode zur quantitativen Milchsäurebestimmung im Harne besteht nun in folgendem Verfahren: 250 ccm Harn werden in einem Meßzylinder gemessen. 2 ccm gesättigte Chlorcalciumlösung und darauf nach Umrühren 15 bis 20 Tropfen einer 10%igen Ammoniaklösung hinzugefügt und umgerührt

und erwärmt. Vom entstandenen Niederschlag wird in eine entsprechend große Porzellanschale abfiltriert und der Niederschlag mit schwach ammoniakalischem Wasser gewaschen. Hat man sich vorher überzeugt, daß Acetessigsäure bzw. Aceton im Harne vorhanden ist, so wird der wieder mit Mineralsäure angesäuerte Harn in der Porzellanschale über einem Drahtnetze mit freier Flamme zum Kochen erhitzt und $^1/_4$ Stunde im Kochen erhalten. Ist keine Acetessigsäure vorhanden, so wird der vom Calciumoxalat abfiltrierte Harn, ohne vorher gekocht zu werden, auf ein Wasserbad gebracht und so lange verdampft, bis bloß wenige Kubikzentimeter einer sirupösen Flüssigkeit zurückbleiben. Mit dem acetessigsäurehaltigen Harn wird nach dem Kochen ebenso verfahren, d. h. er wird am Wasserbade verdampft. Der Sirup wird mit 5 ccm Phosphorsäure vom spezifischen Gewicht 1,094 angesäuert und mit Gips zu einem trockenen, bröckelnden Pulver mittels eines Porzellanspatels verrieben. Es werden für gewöhnlich ca. drei gehäufte Kaffeelöffel Gips hinreichen. Dieses Pulver wird dann quantitativ in eine Schleichersche Extraktionshülse gebracht und im Soxhletapparat mit Äther 8 bis 10 Stunden extrahiert. Darauf wird der Äther auf einem elektrischen Wasserbade oder auf der elektrischen Platte verdampft, so daß keine Spur von Äther und nur eine kleine sirupartige Masse im (weithalsigen) Kölbchen zurückbleibt. Dieser sirupöse Rest im Kölbchen wird dann zur Entwicklung des Kohlenoxyds verwendet. Vorhandene Fettsäuren stören, wie oben auseinandergesetzt wurde, die Reaktion nicht. Als Apparatur dient (übrigens die gleiche wie sie Meissner verwendet):

1. Ein Kippscher Apparat, in dem Kohlendioxyd aus Marmor mittels Salzsäure entwickelt wird, die Kohlensäure wird überdies noch durch zwei mit konzentrierter Schwefelsäure beschickte Drechselsche Flaschen geleitet.

2. Ein dreifach durchbohrter breiter Gummistopfen zum Verschlusse des weithalsigen Kölbchens, das die Lactatlösung enthält. In die drei Bohrungen passen hinein: ein kleiner Schütteltrichter, der mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllt wird und zwei rechtwinklig abgebogene Glasröhren, von denen die eine mit der Drechselschen Flasche, die andere mit dem Azotometer verbunden werden.

3. Ein hohes Azotometer, das mit 50%iger Kalilauge ge-

füllt wird. Die Verbindung zwischen Kippflasche, Drechselschen Flaschen, Kölbchen und wieder Azotometer muß eine vollständig luftdichte sein; beim Öffnen des Hahnes des Kippschen Apparates strömt das Kohlendioxyd in die Drechselschen Flaschen, von hier durch ein rechtwinklig gebogenes Glasrohr in das Kölbchen und aus diesem durch das zweite rechtwinklig gebogene Rohr in das Azotometer. Ist die Apparatur nun ordnungsmäßig zusammengesetzt, so läßt man während 5 Minuten einen Kohlendioxydstrom durch das ganze System streichen, um alle Luft zu entfernen. Dann wird das Azotometer mit Kalilauge gefüllt und noch etwas Kohlensäure durchgelassen, um sich zu überzeugen, ob das Gas im Azotometer von der Kalilauge vollständig absorbiert wird, d. h. ob kein Luftzutritt erfolgt. Ist das nicht der Fall, so muß noch Kohlendioxyd durchgeleitet werden, bis keine Luft im System vorhanden ist. Ist das erreicht, so läßt man aus dem kleinen Schütteltrichter etwas konzentrierte Schwefelsäure in das Kölbchen fließen, gerade genug, um die auf dem Boden des Kölbchens befindliche Lactatlösung zu bedecken. Es muß darauf geachtet werden, daß noch Schwefelsäure im Schütteltrichter zurückbleibe, damit kein Luftzutritt zum Kölbchen erfolge. Hierauf wird mit kleiner Flamme zuerst langsam, nach einer Pause stärker und dann selbst zum Sieden erhitzt. Anfangs tritt ein leichtes Schäumen der Flüssigkeit auf, das bald verschwindet, erst beim stärkeren Erwärmen tritt eine lebhafte Reaktion mit Entwicklung von dichten Dämpfen in der Flüssigkeit auf und es steigen reichlich Blasen von Kohlenoxyd im Azotometer auf. Es genügt, diese starke Reaktion durch Erhitzen dreimal zu erzeugen. Dann läßt man das Gemisch erkalten und sich beruhigen, leitet durch einige Minuten (1 bis 2) den Kohlendioxydstrom durch das System und läßt das abgebundene Azotometer (oder das ganze System) ca. 1 Stunde stehen. Kurz vorher empfiehlt es sich, den Stand des Azotometers einige Male abzulesen. Falls keine Veränderung im Stande der Kalilauge zu verzeichnen ist, wird Thermometer, das in der Nähe des Azotometers aufgestellt sein soll, Barometer und das Azotometer abgelesen. Im anderen Falle läßt man das Azotometer so lange stehen, bis keine Veränderung im Stande der Kalilaugesäule im Azotometer mehr erfolgt.

Da ein Molekül Milchsäure einem Molekül Kohlenoxyd

entspricht, so wird die Berechnung des Gewichtes der im untersuchten Harne enthaltenen Milchsäure mit Hilfe der Küsterschen Logarithmentafeln folgendermaßen gemacht.

Man addiert zum Logarithmus der im Azotometer abgelesenen Zahl den Logarithmus des Stickstoffs bei abgelesener Temperatur und Barometerstand, ferner den Umrechnungslogarithmus CO = 99987 sowie den Logarithmus der Verhältniszahl der Molekulargewichte von CO und Milchsäure = 50732. Zu dieser Summe der vier Logarithmen wird in den Logarithmentafeln der Numerus gesucht, wobei das Einsetzen von bloß zwei Dezimalen genügt. Man erhält so die Menge an Milchsäure in Milligrammen in der verarbeiteten Menge Harn, hier in 250 ccm Harn. Daraus kann man leicht die in der Tagesmenge ausgeschiedene Milchsäure berechnen.

Die Methode ist sehr genau. Bei Zusatz einer quantitativ gewogenen Menge eines Lactates konnte ich mittels dieser Methode 99,88 % wiederfinden.

Vergleichende Untersuchungen mit der v. Fürthschen Methode folgen.

Mit der Kohlenoxydmethode habe ich gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. Falta normale und pathologische Harne bei genau vorgeschriebener diverser Diät auf Milchsäure untersucht; die Resultate werden nach Abschluß der Untersuchungen an anderer Stelle veröffentlicht werden.

Untersuchungen über die Wirkung gewisser Arten von Milchsäurebakterien auf Eiweiß und auf andere Stickstoffverbindungen.

Von

A. Stutzer (Königsberg).

(Eingegangen am 30. April 1915.)

Eine Synthese von Eiweiß können die höheren Tiere nur dann vollziehen, wenn ihnen (außer Kohlenhydraten und unorganischen Verbindungen) gewisse Aminoverbindungen zur Verfügung stehen. Unter diesen dürfen Tyrosin und Tryptophan nicht fehlen. Die Spaltpilze und Hefen sind in der Lage, ihren Stickstoffbedarf aus einfacheren Verbindungen, aus Aminosäuren ohne Benzolkern, auch aus Ammoniaksalzen zu schöpfen, und die höheren Pflanzen bevorzugen zur Eiweißsynthese die Nitrate, verwerten aber auch Ammoniak.

Die Landwirtschaft hat die Aufgabe, das für die menschliche Ernährung nötige Eiweiß zu liefern, und wird stets die wichtigste Aufgabe darin bestehen, dies in ausgiebigster Weise durch chlorophyllhaltige Kulturpflanzen zu bewirken, insbesondere unter Verwendung von atmosphärischem Stickstoff, der entweder durch die Bakterien der Leguminosen oder in chemischen Fabriken in geeignete Stickstoffverbindungen übergeführt wurde.

Außerdem sucht man Spaltpilze und Hefen zur Synthese von Eiweiß bei der Erzeugung von tierischem Futter zu benutzen und bei der Konservierung gewisser Futtermittel dahin zu streben, daß der Abbau von Eiweiß durch Mikroorganismen nicht bis zur Zerstörung von Tyrosin und Tryptophan fortschreitet. Das Tier, das später das Futter verzehrt, ist dann in der Lage, eine Synthese von Eiweiß aus dessen ehemaligen Baustoffen zu bewirken.

Eine beliebte Methode zur Konservierung gewisser Futtermittel (Blätter von Rüben, Mais mit Stengeln, Kartoffeln usw.) besteht darin, daß man derartige Futtermittel in Erdgruben oder in oberirdischen Bauten (Silos) fest einstampft und den Zutritt der atmosphärischen Luft möglichst hindert. Die den Futtermitteln anhaftenden Bakterien vermehren sich, gewisse

Arten bilden aus Kohlenhydraten organische Säuren, und je größer die Menge der Säure ist, desto mehr werden säurefeindliche Bakterien unterdrückt, die Säure konserviert das Futter, nachdem allerdings ein Teil der Nährstoffe von den Bakterien zur Unterhaltung ihres Lebens gedient hatte.

Hierbei werden nicht nur Kohlenhydrate, sondern auch Eiweißstoffe zersetzt, es bilden sich leichtlösliche Aminoverbindungen.

Tritt Buttersäuregärung ein, so sind die Verluste an gärfähigem Material sehr groß. Gering sind sie bei Milchsäuregärung. Um diese einzuleiten, ist es empfehlenswert, das Futter mit Milchsäurebakterien zu impfen, am besten mit den Kaltmilchsäurebakterien (Bac. cucumeris fermentati), die keine höheren Temperaturen beanspruchen.

Bevor in Zukunft diese Art von Milchsäurebakterien zur Impfung von Futter allgemeiner benutzt wird, hat es ein Interesse, festzustellen, ob und wie weit sie Eiweiß zersetzen oder, wenn dies nicht der Fall sein sollte, ob sie vielleicht (ähnlich wie Hefe) eine Synthese von Eiweiß unter Verwendung von einfachen Amiden und Ammoniaksalzen vollziehen können.

Herr Professor Henneberg (Institut für Gärungsindustrie, Berlin) hatte die Güte, uns Reinkulturen jener Milchsäurebakterien zur Verfügung zu stellen und ich habe in Gemeinschaft mit meinem Assistenten Dr. Goy einige Versuche ausgeführt.

1. Die Wirkung von Milchsäurebakterien auf pflanzliches Eiweiß.

a) Versuche mit sterilisiertem Wiesenheu.

Durch Versuche sollte festgestellt werden, ob die im Heu enthaltenen Eiweißstoffe durch Milchsäurebakterien zu löslichen Aminoverbindungen abgebaut werden.

Versuchsreihe 1.

Je 1 g von gemahlenem Wiesenheu wurde in kleine Erlenmeyerkolben gebracht, 50 ccm Wasser hinzugegossen, ein Wattestopfen auf das Glas gesetzt und dieses mit Inhalt an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 30 Minuten lang in strömendem Dampf sterilisiert. Dann ist ein Teil der Proben mit Warmmilchsäurebakterien (Bac. Delbrückii), ein anderer Teil mit Kaltmilchsäurebakterien (Bac. cucumeris fermentati) geimpft. Erstere ließen wir 14 Tage lang in einem auf 37° und letztere die gleiche Zeit in einem auf 27° erwärmten Thermostaten stehen.

Bei der Analyse wurden die Eiweißstoffe in üblicher Weise durch Zusatz von Kupfersulfat und Natronlauge gefällt, nachdem die freie Säure zuvor durch Zugabe von wenig Calciumcarbonat an Kalk gebunden war. Die Flüssigkeit haben wir abfiltriert und im Unlöslichen den Stickstoff nach Methode Kjeldahl bestimmt. Das Filtrat diente nach Zugabe von Magnesia zur Feststellung der Menge des in Form von Ammoniak vorhandenen Stickstoffs. Ein Teil der Kulturen ist zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs benutzt und direkt, ohne Filtration mit Schwefelsäure aufgeschlossen.

Versuchsreihe 2.

Diese Versuchsreihe unterschied sich von 1 dadurch, daß neben 1 g des Wiesenheues 1 g Zucker verwendet wurde. Nach Verlauf von 14 Tagen sind vor Beginn der chemischen Untersuchung kleine Mengen der Flüssigkeit mit der Platinöse zur bakteriologischen Untersuchung herausgenommen. Es ergab sich, daß von 12 mit Warmmilchsäurebakterien (ohne Zuckerzusatz) geimpften Kulturen 6 Stück durch Bac. subtilis verunreinigt waren. Die übrigen 6 Gläser, sowie die mit Zucker versetzten (also stärker sauer gewordenen Flüssigkeiten) und sämtliche Kulturen mit Kaltmilchsäurebakterien waren rein.

Kulturen, die subtilis enthielten, machten auch dadurch sich kenntlich, daß die Flüssigkeit dunkel gefärbt war. Vielleicht hatte subtilis einen Teil des Chlorophylls unter Auftreten von dunklen Farbstoffen zerstört.

Ergebnisse der Untersuchungen. Die Kontrollanalysen stimmten recht gut untereinander überein.

Bezeichnung	Stickstoff ganze Menge	Stickstoff als Eiweiß	Stickstoff als Ammoniak
Versuchsreihe 1.			
Warmmilchsäurebakterien	1,75 %	1,30 %	0,08 %
Kaltmilchsäurebakterien	1,75 %	1,35 %	0,08 %
Kulturen durch subtilis verunreinigt	1,75 %	1,13 %	0,27 %
Versuchsreihe 2.			
Warmmilchsäurebakterien	1,74 %	1,30 %	0,08 %
Kaltmilchsäurebakterien	1,75 %	1,34 %	0,07 %
Das verwendete Heu enthielt im ursprünglichen Zustande	1,75 %	1,34 %	0,09 %

Wir ersehen hieraus, daß beide Arten von Milchsäurebakterien einen Abbau des pflanzlichen Eiweißes zu Amiden nicht vorgenommen haben. Sie lebten vom vorhandenen Eiweiß und erzeugten hieraus Bakterieneiweiß, soweit dies zum Aufbau ihrer Zellen nötig war.

Professor Henneberg hatte in einem im April 1915 in Berlin gehaltenen Vortrage geäußert, daß die Milchsäurebakterien einen Abbau von pflanzlichem Eiweiß nicht vornehmen und wir haben diese Angabe bestätigt gefunden.

Säurebestimmungen.

Bei einigen Kulturen hatten wir die Menge der erzeugten Säure in der Weise ermittelt, daß wir nach 14 tägigem Stehen im Thermostaten das Unlösliche abfiltrierten und mit Wasser auswuschen, bis die ablaufende Flüssigkeit vollkommen neutral war. Dann wurde mit 5 n-Natronlauge titriert. Zur Säurebestimmung sind nur die Kulturen mit Kaltmilchsäurebakterien benutzt. Erzeugt war ohne Zuckerzusatz 0,030 g Milchsäure. Mit Zuckerzusatz 0,283 g Milchsäure.

b) Versuche mit nicht sterilisiertem Heu.

Verwendet ist stets 1 g von demselben Wiesenheu wie beim vorigen Versuch, außerdem 1 g Zucker und 50 ccm Wasser. Die Kulturen blieben teils bei 37°, teils bei 27° 3 Wochen lang im Thermostaten stehen, bevor der Gehalt an Stickstoff und Säure ermittelt wurde.

Bezeichnung	Stickstoff ganze Menge	Stickstoff als Eiweiß	Stickstoff als Ammoniak
Versuchsreihe 1.			
Mit Milchsäurebakterien nicht geimpft			
bei 27° aufbewahrt . . .	1,74%	1,48%	0,0%
„ 37° „ . . .	1,74%	1,46%	0,0%
Versuchsreihe 2.			
Mit Warmmilchsäurebakterien geimpft	1,74%	1,57%	0,0%
Mit Kaltmilchsäurebakterien geimpft	1,74%	1,57%	0,0%

Ermittlungen des Säuregehaltes, berechnet auf Milchsäure.

Versuchsreihe 1.

Nicht geimpft, bei 27° aufbewahrt . .	0,30 g Säure
„ „ „ 37° „ . .	0,22 g „

Versuchsreihe 2.

Mit Warmmilchsäurebakterien	geimpft	0,24 g	"
" Kaltmilchsäurebakterien	"	0,46 g	"

Bei diesen Versuchen hatten die verschiedensten Organismen, auch Schimmelpilze, sich entwickelt. Durch den zugesetzten Zucker waren säurebildende Bakterien zur Entwicklung gelangt, die Säure hinderte die Tätigkeit der Fäulnisbakterien während der nur 3 wöchentlichen Versuchsdauer bei 27 bzw. 37°. Ein Abbau von Eiweißstoffen zu Amiden fand unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht statt, die Kaltmilchsäurebakterien erzeugten größere Mengen von Säure als andere. Es sei noch bemerkt, daß bei den Kontrollbestimmungen die Stickstoffanalysen wieder sehr gut übereinstimmten, bei den Säurebestimmungen der nicht sterilisierten Kulturen kamen größere Schwankungen als bei der Versuchsreihe a) vor. Hatten Schimmelpilze sich üppiger entwickelt, so war der Säuregehalt geringer.

Das Gesamtergebnis dieser Versuche besteht darin, daß bei der Bereitung von Sauerfutter und Silage die Kaltmilchsäurebakterien aus Zucker schnell Säure bilden und eine Zersetzung von Eiweiß unter Entstehung von Amiden nicht veranlassen.

Bekanntlich werden bei Vorhandensein von Milchsäure und bei gleichzeitigem Abschluß der atmosphärischen Luft die den Abbau von Eiweiß begünstigenden Fäulnisbakterien in ihrer Entwicklung gehemmt, und scheint daher die „Impfung" eines zu konservierenden, nicht getrockneten Futters mit Kaltmilchsäurebakterien sehr wichtig zu sein.

2. Untersuchungen über die Eiweißsynthese durch Kaltmilchsäurebakterien unter Verwendung von Ammonacetat, Asparagin und Harnstoff als Stickstoffquellen.

Aus den im vorigen Abschnitt erwähnten Versuchen ging hervor, daß die Kaltmilchsäurebakterien das dargebotene Eiweiß gut verwerten. Die 2 bzw. 3 Wochen lang fortgeführten Kulturen enthielten nach Maßgabe bakteriologischer Untersuchungen reichliche Mengen dieser Bakterien, und ein Abbau des dargebotenen Eiweißes zu einfacheren Aminoverbindungen hatte nicht stattgefunden.

Es sollte festgestellt werden, ob die Kaltmilchsäurebakterien befähigt sind, einen Aufbau von Eiweiß zu vollziehen, wenn

man ihnen als alleinige Stickstoffquelle Ammonacetat oder Asparagin oder Harnstoff darbietet.

a) Versuche mit Ammonacetat.

Die benutzte Nährlösung enthielt in je 50 ccm Leitungswasser 1,0 g Zucker, 0,20 g Kaliumphosphat, 0,025 g Magnesiumsulfat und 0,025 g Calciumchlorid. Außerdem waren darin ungefähr 0,40 g Ammonacetat gelöst. Das Ammonacetat war chemisch rein, aber etwas feucht und jede Kultur enthielt 0,0766 g Stickstoff in Form von Ammonacetat.

Die schwach sauer reagierende Flüssigkeit wurde 3 mal im strömenden Dampf sterilisiert und mit Kaltmilchsäurebakterien geimpft. Die Kulturen ließen wir 14 Tage lang in einem auf 28° erwärmten Thermostaten stehen, dann wurde in der im vorigen Abschnitt beschriebenen Weise der Gehalt an Eiweißstickstoff bestimmt, nachdem zuvor die saure Reaktion durch Zugabe von Calciumcarbonat abgestumpft war. Von 0,0766 g des ursprünglich vorhandenen Ammoniakstickstoffs hatten durchschnittlich 0,0014 g Stickstoff zur Bildung von Eiweiß gedient, das Ammonacetat scheint also keine besonders günstige Stickstoffquelle für diese Bakterien zu sein, welche Tatsache auch schon daraus zu ersehen war, daß bei den im vorigen Abschnitt unter a) bezeichneten Versuchen das ursprünglich vorhandene Ammoniak durch die Milchsäurebakterien nicht verzehrt wurde.

b) Versuche mit Asparagin.

Versuchsdauer 10 Tage bei 28°. Die Nährlösung hatte die gleiche Menge von Mineralstoffen und Zucker wie unter a) angegeben, und von Asparagin 0,5 g in je 50 ccm der Flüssigkeit.

Die sterilisierte Flüssigkeit enthielt 0,0913 g Stickstoff, davon 0,0068 g Stickstoff in Form von Ammoniak (Destillation mit Magnesia). Nach 10 Tagen war die Menge des Gesamtstickstoffs dieselbe wie vorher, leider schwankte aber der Gehalt der Kulturen an Eiweißstickstoff und Stickstoff in Form von Ammoniak nach 10 tägiger Einwirkung der Bakterien ziemlich stark.

	Stickstoff in Form von Eiweiß	Stickstoff in Form von Ammonik	Säuregehalt
	0,0157 g	0,0154 g	nicht ermittelt
	0,0126 g	0,0207 g	0,446 g
	0,0193 g	0,0218 g	0,468 g
Mittel	0,0159 g	0,0193 g	0,457 g

c) Versuche mit Harnstoff.

Die Versuche sind in gleicher Weise wie die mit Asparagin angestellten ausgeführt, nur mit dem Unterschiede, daß statt des Asparagins 0,20 g Harnstoff gegeben waren, jede Kultur enthielt 0,0915 g Gesamtstickstoff, wovon beim Destillieren mit Magnesia 0,013 g Stickstoff in Form von Ammoniak abgespalten wurden.

	Stickstoff in Form von Eiweiß	Stickstoff in Form von Ammoniak	Säuregehalt
	0,0040 g	0,0134 g	0,290 g
	0,0081 g	0,0129 g	0,265 g
Mittel	0,0060 g	0,0131 g	0,277 g

Bei zwei Versuchen waren der Flüssigkeit vor der Impfung mit Bakterien geringe Mengen von Calciumcarbonat gegeben. Bei Beendigung des Versuchs ist an Eiweißstickstoff in diesen Kulturen vorhanden gewesen:

0,0056 g
0,0064 g Stickstoff,

also mit dem andern Versuch übereinstimmend.

d) Versuchsergebnisse.

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen waren von je 100 Teilen des gegebenen Stickstoffs in Eiweißstickstoff verwandelt:

Stickstoffquelle	
Ammonacetat . . .	1,8 Teile
Asparagin	17,4 „
Harnstoff	6,5 „

Somit sind alle drei Stickstoffverbindungen keine hervorragenden Nährstoffe für die Kaltmilchsäurebakterien, und ist anzunehmen, daß diese Bakterien vorwiegend bereits vorhandenes Eiweiß zu ihrer Ernährung verwenden.

Die Versuche waren wesentlich zu dem Zweck ausgeführt, um in Erfahrung zu bringen, ob bei der Einsäuerung von Futtermitteln im landwirtschaftlichen Betriebe unter Verwendung von Kaltmilchsäurebakterien es möglich ist, den Eiweißgehalt des Futters durch Zugabe einfacherer Stickstoffverbindungen in praktisch nutzbarer Weise zu erhöhen. Nach Maßgabe der vorstehend erwähnten Versuche müssen diese Bestrebungen insofern als aussichtslos bezeichnet werden, als die Milchsäurebakterien keine ergiebige Eiweißsynthese vollziehen, während gleichzeitig vorhandene Hefearten selbstverständlich als Eiweißbildner zu gelten haben.

Untersuchungen über die Diazoreaktion des Hundeharnes und ihre Beziehungen zu Stoffwechselvorgängen.

Von

M. Masslow (St. Petersburg).

(Ausgeführt unter der Leitung des a. o. Prof. Dr. O. v. Fürth im Physiologischen Institut der Wiener Universität.)

(Eingegangen am 3. Mai 1915.)

Mit 2 Figuren im Text.

Durch die Untersuchungen von M. Weiß ist ein Zusammenhang zwischen der rätselhaften Ehrlichschen Diazoreaktion pathologischer Harne und dem normalen gelben Harnfarbstoff, dem Urochrom, klargestellt und gezeigt worden, daß dieselbe an die Muttersubstanz des Urochroms, das Urochromogen, geknüpft ist; das letztere bildet einen Bestandteil jener Fraktion hochmolekularer Schlackenstoffe des Stoffwechsels, die unter der Bezeichnung der Oxyproteinsäuren zusammengefaßt werden. Jedoch auch der normale Harn gibt mit Diazoreagenzien eine, wenn auch schwächere Färbung, die nach Clemens angeblich von Oxyphenylverbindungen (Tyrosin, Oxyphenylpropionsäure, Oxyphenylessigsäure) bedingt sein soll. Sicherlich ist dies nicht ausschließlich der Fall. Nach Kutscher und Engeland bleiben auch im normalen Harne nach Entfernung der aromatischen Oxysäuren durch Äther noch Körper zurück, die in sodaalkalischer Lösung mit Diazobenzosulfosäure rote Produkte liefern. Diese Reaktion scheint Imidazolkernen eigentümlich zu sein, die im Harne in Form von Imidazolaminopropionsäure (Histidin), sowie von Imidazolaminoessigsäure vorkommen sollen. Nach den Untersuchungen von M. Weiß kann es jedoch keinem Zweifel unterliegen, daß auch hochmolekulare Substanzen vom Typus der Oxyproteinsäuren an der Diazoreaktion des normalen Harnes sehr wesentlich beteiligt sind, und man wird schwerlich mit der Annahme fehlgehen, daß dieselbe ihre chromogene Natur einem der zyk-

lischen Komplexe des Eiweißmoleküls (bzw. einem Umwandlungsprodukte eines solchen) verdanken, den sie in irgend einer Form einschließen[1]).

Nun haben M. Weiß und N. Ssobolew[2]) gezeigt, daß die von Pauly zum Nachweise des Histidins angegebene Farbenreaktion mit Diazobenzolsulfosäure unter Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen für die colorimetrische Bestimmung desselben verwertet werden kann. Weiterhin hat sich nun Weiß[3]) davon überzeugt, daß dieses Verfahren auch auf den Harn Anwendung finden kann: man ist einerseits imstande, dem Harne zugesetztes Histidin mit ausreichender Genauigkeit wieder aufzufinden; andererseits aber kann man auch die Diazoreaktion des normalen Harnes colorimetrisch auswerten, wobei man die Rechnung so ausführt, als ob das die Diazoreaktion gebende Chromogen freies Histidin wäre. Diese Annahme ist nun freilich nicht nur nicht bewiesen, sondern auch dem Gesagten zufolge durchaus unwahrscheinlich: Weder ist es bewiesen, daß es sich ausschließlich um Histidin-, nicht aber um Oxyphenylkomplexe handle, noch aber ist es wahrscheinlich, daß derartige Komplexe ganz oder auch nur zum größten Teile im freien Zustande auftreten. Wenn also im folgenden von colorimetrisch ermittelten „Histidinwerten“ die Rede ist, so sind solche nicht anders denn als colorimetrische Hilfswerte zu verstehen.

Während nun M. Weiß durch systematische, am Menschenharne durchgeführte Untersuchungen sich bemüht, näheren Aufschluß über die chemische Natur der „Diazochromogene“ des Harnes zu erlangen, bin ich, einer Aufforderung Prof. v. Fürths folgend und im Einvernehmen mit M. Weiß, darangegangen, auf dem Wege der physiologischen Stoffwechseluntersuchung die Frage zu beantworten, ob ein Zusammenhang zwischen der Menge im Harne ausgeschiedener Diazochromogene und dem Quantum von Histidinkomplexen bestehe, die mit der Nahrung in den Körper eingeführt oder

---

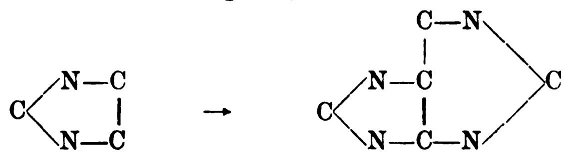
[1]) Vgl. die Literatur bei O. v. Fürth, Probleme der physiol. u. pathol. Chem. 2, 135 bis 144, 1913.

[2]) M. Weiß und N. Ssobolew (Physiologisches Institut der Wiener Universität), Über ein colorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Histidins. Diese Zeitschr. 58, 119, 1913.

[3]) Unveröffentlichte Untersuchungen.

aber durch Körpereiweißzerfall in Zirkulation gesetzt werden.

Über die Schicksale des Histidins im intermediären Stoffwechsel ist wenig bekannt. Die naheliegende Vermutung, daß der Imidazolkern desselben beim Aufbau von Purinkernen wesentlich beteiligt sei,



hat weder durch die Untersuchungen Abderhaldens[1]) und seiner Mitarbeiter noch durch diejenigen K. Kowalewskys[2]) eine Stütze erhalten. Man weiß nur so viel, daß in den Organismus künstlich eingeführtes Histidin zum allergrößten Teile im intermediären Stoffwechsel zerstört wird, ohne in Purinkörper oder in Allantoin überzugehen, wobei der Stickstoff desselben offenbar hauptsächlich als Harnstoff zum Vorschein kommt.

Überlegt man nun, in welcher Form Histidinkomplexe dem Organismus im wesentlichen zugeführt werden, so ergibt sich folgendes:

Da das Histidin, wie bekannt, einen wichtigen Bestandteil echter Eiweißkörper bildet, ist es klar, daß jeder Eiweißzerfall, ob es sich nun um Körpereiweiß oder aber um Nahrungseiweiß handeln möge, zum Übertritt von Histidinkomplexen in die Zirkulation führen muß. Nun wissen wir aber weiterhin, daß keineswegs alle Eiweißkörper in bezug auf ihren Histidingehalt gleichwertig sind. Insbesondere das Hämoglobin ist durch den Histidinreichtum seiner Eiweißkomponente, des Globins, ausgezeichnet. Wir werden daher annehmen dürfen, daß überall dort, wo Blutfarbstoff in größeren Mengen im Organismus zerfällt, eine Überschwemmung des Organismus mit Histidin die unmittelbare Folge dieses Vorganges sein wird.

Der Eiweißzerfall im Organismus stellt aber für den Fleischfresser weder die ausschließliche, noch aber auch nur die wich-

---

[1]) E. Abderhalden und H. Einbeck, Zeitschr. f. physiol. Chem. **62**, 322, 1909. — E. Abderhalden, H. Einbeck und J. Schmidt, ibid. **68**, 395, 1910.

[2]) K. Kowalewsky, diese Zeitschr. **23**, 1, 1910.

tigste Histidinquelle dar. Als solche ist vielmehr zweifellos ein Extraktivstoff des Fleisches, das Carnosin, anzusehen, das von Gulewitsch als ein aus Histidin und β-Alanin zusammengesetztes Dipeptid gedeutet wird. Nach den Untersuchungen von O. v. Fürth und C. Schwarz entfällt in der Skelettmuskulatur des Pferdes etwa ein Drittel des Extraktivstoffes auf eine vorwiegend aus Carnosin bestehende Fraktion, und zwar ist in einer solchen (nach O. v. Fürth und Th. Hryntschak[1]) je 1 kg Fleisch entsprechend 2 bis 3 g Karnosin enthalten. Es ist also klar, daß nach einer reichlichen Mahlzeit unausgekochten Fleisches die aus dem zerfallenden Nahrungseiweiß entstammenden Histidinmengen hinter jenen Quanten, die dem Karnosin entstammen, vollständig in den Hintergrund treten müssen.

3. Durch die vorstehend angeführten Überlegungen erscheinen die Richtungslinien für meine Untersuchung, welche die Diazoreaktion des Hundeharnes und ihre Beziehungen zu Stoffwechselvorgängen zum Gegenstande haben sollte, gegeben:

Zwei Hunde (von 14 und 13 kg Körpergewicht) wurden einige Zeit lang reichlich und ganz gleichmäßig mit rohem Pferdefleisch (400 g) und mit Kartoffeln (200 g) gefüttert, wobei ch (wie überhaupt während des ganzen Versuchs) nach dem Verfahren von M. Weiß und N. Ssobolew die Menge des Diazochromogens im Harne colorimetrisch bestimmte („I. Versuchperiode").

In der darauf folgenden „II. Versuchsperiode" wurde die Gesamteiweiß- und Kohlenhydratzusammensetzung der Nahrung beibehalten, die Eiweißqualität der Nahrung aber dahin abgeändert, daß das histidinarme Muskeleiweiß durch histidinreiches Bluteiweiß ersetzt wurde. (Tägliches Futter: 400 g Blutwurst + 200 g Kartoffeln.)

In der „III. Versuchsperiode" kehrten wir wieder zum Pferdefleisch zurück, doch verfütterten wir dasselbe nunmehr nicht im rohen, vielmehr in sorgfältig ausgekochtem Zustande, derart, daß dasselbe von dem in großen Mengen darin enthaltenen Carnosin befreit war. (Tägliches Futter: 400 g ausgekochtes Pferdefleisch + 200 g Kartoffeln).

[1]) O. v. Fürth und Th. Hryntschak, diese Zeitschr. 64, 172, 1914.

4. Versuchsprotokolle.

Versuch 1.

Weißer Hund, Gewicht 14 kg.

Datum	Versuchs-periode	Harnvolumen in 24 Std.	Diazochromogen als Histidin-HCl berechnet		Urochrom in Echtgelbeinheiten		Gesamtstickstoff-ausscheidung		Verabreichung
			pro Tag	pro 100 ccm	pro Tag	pro 100 ccm	pro Tag	pro 100 ccm	
		ccm	g	g	g	g	g	g	
6. V.	Ia	300	0,1020	0,034	630	210	—	—	400 g rohes Pferdefleisch + 200 g Kartoffeln
7.	„	525	0,1446	0,026	384	73	—	—	
8.	„	270	0,2268	0,084	1217	528	—	—	
9.	„	610	0,1372	0,022	502	82	—	—	
11.	„	390	0,1280	0,033	—	—	11,495	2,94	
16.	Ib	315	0,1540	0,049	1080	340	9,261	2,94	
17.	„	315	0,1764	0,056	1890	600	8,914	2,83	
	Mittel	389	**0,1527**	0,043	950	—	9,880	—	
12. V.	II	385	0,1964	0,051	880	228	11,040	2,86	400 g Blutwurst + 200 g Kartoffeln
13.	„	250	0,1230	0,049	500	200	8,525	3,41	
14.	„	455	0,1547	0,034	575	126	—	—	
15.	„	625	0,1562	0,025	1973	315	9,750	1,56	
	Mittel	428	**0,1575**	0,040	982	—	9,750	—	
18. V.	III	475	0,2475	0,052	3562	773	14,250	3,00	400 g gekochtes Pferdefleisch + 200 g Kartoffeln
19.	„	300	0,1440	0,048	774	258	8,220	2,74	
20.	„	400	0,1760	0,044	721	180	10,960	2,76	
21.	„	330	0,1910	0,058	2475	750	12,220	3,70	
	Mittel	376	**0,1895**	0,050	1878	—	11,410	—	
22. V.	IV	185	0,1063	0,058	744	402	4,199	2,27	Hungerperiode (nur Wasser)
23.	„	120	0,0924	0,077	424	353	3,318	2,93	
24.	„	65	0,0546	0,091	—	—	1,302	2,00	
25.	„	50	—	—	—	—	—	—	
	Mittel	123	**0,0844**	0,075	584	—	2,939	—	
26. V.	V	175	0,2135	0,122	—	—	5,320	3,03	400 g Kartoffeln
27.	„	315	0,1543	0,049	728	231	2,756	0,87	
28.	„	150	0,0772	0,051	190	126	2,226	1,78	
	Mittel	213	**0,1483**	0,074	459	—	3,467	—	
29. V.	VI	440	0,2024	0,046	839	190	13,644	3,10	800 g Pferdefleisch
30.	„	415	0,1494	0,036	612	147	10,212	2,46	
	Mittel	427	**0,1759**	0,041	726	—	11,928	—	Phosphor
4. VI.	VII	600	0,1980	0,033	847	141	12,516	2,08	0,003 g; 400 g rohes Pferdefleisch + 200 g Kartoffeln
5.	„	300	0,1425	0,047	1200	400	6,048	2,01	
6.	„	250	0,1540	0,062	1500	600	4,812	1,92	0,004 g
8.	„	420	0,3570	0,084	2520	609	12,312	2,93	0,004 g
9.	„	260	0,2179	0,084	1560	600	10,319	3,95	
10.	„	475	0,3082	0,065	3562	750	14,592	3,05	0,005 g
11.	„	350	0,2800	0,080	2100	600	12,543	3,58	
12.	„	525	0,3675	0,070	3600	685	15,757	3,00	0,006 g
13.	„	430	0,3354	0,078	860	200	12,732	2,96	0,006 g
	Mittel	423	**0,3220**	0,067	1972	—	11,292	—	

Versuch 1 (Fortsetzung).

Datum	Versuchsperiode	Harnvolumen in 24 Std.	Diazochromogen als Histidin-HCl berechnet		Urochrom in Echtgelbeinheiten		Gesamtstickstoffausscheidung		Verabreichung
			pro Tag	pro 100 ccm	pro Tag	pro 100 ccm	pro Tag	pro 100 ccm	
		ccm	g	g	g	g	g	g	
16. VI.	VIII	730	0,2920	0,040	8760	1200	12,519	1,71	Erbrechen. Verweigerung der Nahrungsaufnahme.
17.	„	300	0,1200	0,040	1440	480	5,880	1,82	
18.	„	115	0,1120	0,097	1140	1000	3,126	2,72	
19.	„	100	0,0970	0,097	992	992	2,721	2,72	
	Mittel	310	**0,1550**	0,068	3083	—	6,061	—	

Als „IV. Versuchsperiode“ folgte nunmehr eine Hungerperiode, wo die Hunde nur Wasser erhielten.

Die „V. Versuchsperiode“ war eine Periode sehr eiweißarmer Ernährung. (Tägliches Futter: 400 g Kartoffeln).

Darauf folgte eine „VI. Versuchsperiode“ reichlicher Eiweißernährung mit rohem Pferdefleisch, von dem die Hunde täglich doppelt soviel als zu Anfang des Versuchs (800 g) erhielten.

Der Versuch wurde durch die „VII. Versuchsperiode“ fortgesetzt, in der ein toxischer Eiweißzerfall durch eine mit kleinen Phosphordosen langsam eingeleitete Vergiftung bei normaler Ernährung (täglich 400 g rohes Pferdefleisch + 200 g Kartoffeln) herbeigeführt wurde.

Die „VIII. Versuchsperiode“, wo die fortschreitende Vergiftung Erbrechen und Nahrungsverweigerung herbeiführte, brachte den Versuch zum Abschluß.

In bezug auf die Versuchstechnik sei noch bemerkt, daß, den Anweisungen von M. Weiß zufolge, der täglich aufgesammelte Harn zuerst mit Bleizucker (40 ccm 20%iger Lösung auf 100 ccm Harn) ausgefällt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit, mit Natriumcarbonat neutralisiert, sodann dem colorimetrischen Verfahren nach Weiß und Ssobolew unterworfen wurde.

Wegen der erwiesenen Beziehungen des Urochroms zu den Diazochromogenen des Harnes wurde auch das Urochrom im Tagesharne nach dem Verfahren von M. Weiß[1]) nach

[1]) M. Weiß, Sitzungsber. d. Wiener Akad. CXXII, Abt. II, Januar 1913.

Versuch 2.

Gelber Hund, 12 kg Gewicht.

Datum	Versuchsperiode	Harnvolumen in 24 Std.	Diazochromogen als Histidin-HCl berechnet		Urochrom in Echtgelbeinheiten		Gesamtstickstoffausscheidung		Verabreichung
			pro Tag	pro 100 ccm	pro Tag	pro 100 ccm	pro Tag	pro 100 ccm	
		ccm	g	g	g	g	g	g	
6. V.	I a	—	—	—	—	—	—	—	400 g rohes Pferdefleisch + 200 g Kartoffeln
7.	„	585	0,1989	0,034	561	96	—	—	
8.	„	260	0,1342	0,052	312	120	—	—	
9.	„	600	0,3078	0,051	1200	200	—	—	
11.	„	280	0,0935	0,033	612	240	9,156	3,26	
16.	I b	535	0,2177	0,041	357	66	10,320	1,93	
17.	„	265	0,1378	0,052	848	320	6,439	2,42	
	Mittel	420	**0,1816**	0,044	658	—	8,638	—	
12. V.	II	235	0,1062	0,049	403	170	9,201	3,91	400 g Blutwurst + 200 g Kartoffeln
13.	„	500	0,2060	0,041	800	160	15,050	3,01	
14.	„	720	0,3024	0,042	1234	170	—	—	
15.	„	450	0,1530	0,034	432	96	12,930	2,87	
	Mittel	528	**0,1919**	0,041	667	—	12,390	—	
18. V.	III	690	0,3450	0,049	920	133	18,216	2,64	400 g gekochtes Pferdefleisch + 200 g Kartoffeln
19.	„	465	0,2492	0,054	620	133	10,834	2,33	
20.	„	780	0,2652	0,034	850	109	17,920	2,30	
21.	„	300	0,1440	0,048	720	240	7,492	2,49	
	Mittel	734	**0,2508**	0,046	777	—	14,117	—	
22. V.	IV	410	0,2251	0,055	373	90	10,783	2,63	Hungerperiode (nur Wasser)
23.	„	210	0,1102	0,052	690	328	5,079	2,41	
24.	„	215	0,1670	0,077	2866	1333	4,741	2,20	
25.	„	85	0,0322	0,038	—	—	—	—	
	Mittel	230	**0,1336**	0,056	1309	—	6,867	—	
26. V.	V	90	0,0600	0,066	—	—	—	—	400 g Kartoffeln
27.	„	430	0,1978	0,046	2189	508	7,224	1,68	
28.	„	370	0,0710	0,019	370	100	4,441	1,20	
	Mittel	297	**0,1096**	0,043	1279	—	5,832	—	
29. V.	VI	720	0,1663	0,023	864	120	14,213	1,97	800 g Pferdefleisch
30.	„	700	0,1890	0,027	883	126	7,198	1,02	
	Mittel	710	**0,1777**	0,025	873	—	10,705	—	Vergiftung:
4. VI.	VII	550	0,2002	0,036	455	82	7,600	1,38	0,002 P; 400 g rohes Pferdefleisch + 200 g Kartoffeln
5.	„	400	0,1260	0,082	533	122	11,200	2,80	—
6.	„	530	0,1480	0,028	530	100	—	—	0,003 P
8.	„	825	0,2560	0,029	675	81	14,320	1,73	0,004 P
9.	„	450	0,1629	0,036	490	109	10,960	2,43	—
10.	„	775	0,2092	0,027	823	106	15,440	1,99	0,005 P
11.	„	820	0,1943	0,024	935	114	—	—	0,005 P
	Mittel	621	**0,2050**	0,030	634	—	9,900	—	

Versuch 2 (Fortsetzung).

Datum	Versuchs-periode	Harnvolumen in 24 Std.	Diazochromogen als Histidin-HCl berechnet		Urochrom in Echtgelbeinheiten		Gesamtstickstoff-ausscheidung		Verabreichung
			pro Tag	pro 100 ccm	pro Tag	pro 100 ccm	pro Tag	pro 100 ccm	
		ccm	g	g	g	g	g	g	
14. VI.	VIII	600	0,2100	0,035	1371	228	10,280	1,71	Erbrechen, Verweigerung der Nahrungsaufnahme
15.	"	600	0,2100	0,035	1371	228	9,208	1,53	
16.	"	810	0,1620	0,020	972	120	8,505	1,50	
17.	"	800	0,1600	0,020	640	80	6,668	0,83	
18.	"	525	0,1013	0,019	651	124	3,175	0,60	
19.	"	550	0,1072	0,019	682	124	3,333	0,66	
	Mittel	653	0,1680	0,025	949	—	6,861	—	

Beseitigung der durch Bleiacetat fällbaren Substanzen durch Vergleich mit einer Echtgelblösung in relativen Einheiten ausgewertet.

5. Erörterung der Versuchsergebnisse. Überlegen wir nunmehr, welche Schlüsse aus den vorliegenden Versuchsergebnissen gezogen werden können!

Wir vergleichen die als Histidin ausgewerteten Diazochromogenzahlen des ersten Versuches: Als mittlerer Normalwert für den mit Pferdefleisch und Kartoffeln gefütterten Hund ergibt sich hier 0,152. Der Übergang zu einer Kost, wo das Fleisch gegen das in seinem Proteinbestand außerordentlich viel histidinreichere Bluteiweiß ersetzt ist, bewirkte keine Änderung dieses Normalwertes (0,157). Befreite man das Fleisch durch Auskochen von den großen, in Form von Carnosin darin enthaltenen Histidinmengen, so erfuhr die Diazochromogenmenge nicht nur keinerlei Abnahme, sondern sogar eine geringe Zunahme (0,189). Der Hungerperiode entsprach eine starke Abnahme des Chromogens (0,084). Die Kohlenhydratperiode gab wieder den Normalwert (0,148). Die Verdoppelung der Pferdefleischmenge in der Futterration hatte nicht etwa eine Verdoppelung der Chromogenausscheidung zur Folge, sondern nur eine ganz unbedeutende Zunahme (0,176). Eine Verdoppelung der Normalwerte ergab sich jedoch bei Einleitung einer Phosphorvergiftung im ersten Stadium ungestörter Ernährung (0,322). Im zweiten Vergiftungsstadium sank die Chromogenausscheidung trotz Nahrungsverweigerung nicht etwa

auf das Hungerniveau herab, sondern hielt sich auf dem Normalwerte (0,155).

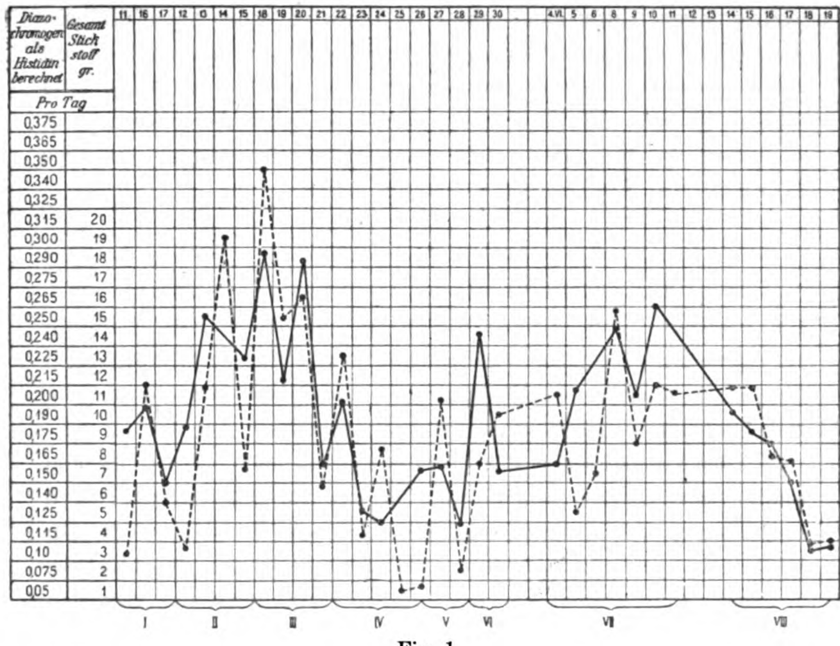
Im zweiten Versuche erscheint 0,182 als Normalwert. Fütterung mit histidinreichem Bluteiweiß statt mit histidinarmem Fleischeiweiß bewirkt auch hier keine Änderung (0,192). Entfernung des Carnosins aus dem Pferdefleische durch Auskochen bewirkt auch hier, statt des erwarteten Abfalles, einen geringen Anstieg des Diazochromogens (0,251). Hunger und einseitige Kohlenhydratfütterung veranlassen ein Absinken (0,133 und 0,109). Auch bei verdoppelter Fleischration kommt der Normalwert wieder zum Vorschein (0,178), den hier auch die Phosphorvergiftung in ihren beiden Stadien nicht wesentlich zu verschieben vermag.

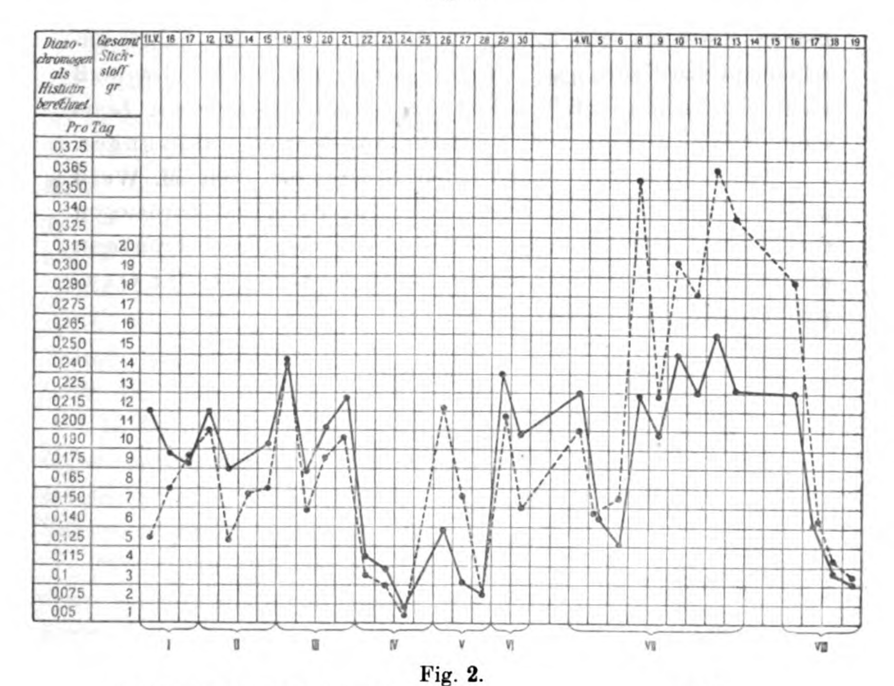
Die Urochromausscheidung hat sich in meinen Versuchen so regellos gestaltet, daß ich darauf verzichten möchte, irgendwelche Folgerungen aus denselben zu ziehen, um so mehr, als es noch besonderer Versuche bedürfen wird, um sicherzustellen, ob der Farbstoff des mit Bleizucker ausgefällten Hundeharnes wirklich ausschließlich Urochrom sei.

Registriert man die Gesamtstickstoffausscheidung (zusammenhängende Linie) und die Diazochromogenausscheidung (punktierte Linie) in Kurvenform, so genügt ein Blick auf die beiden Kurvenbilder (Tafel 1 und 2), um uns die bemerkenswerte Tatsache vor Augen zu führen, daß die Kurven der Gesamt-N-Ausscheidung und der Chromogenausscheidung einen durchaus gleichsinnigen Verlauf zeigen: Jedem Anstiege der einen entspricht ein Anstieg der anderen. Daraus folgt, daß die Ausscheidung des Diazochromogens mit dem Eiweißumsatz im Organismus innig zusammenhängen muß.

Da aber die Verdoppelung der umgesetzten Nahrungseiweißmenge in beiden Versuchen ohne Effekt war, während (wenigstens im ersten Versuche) die Steigerung des Gewebseiweißzerfalles einen hochgradigen Anstieg der Chromogenausscheidung zur Folge hatte, wird man vermuten dürfen, daß das Chromogen nicht sowohl exogenen als vielmehr in erster Linie endogenen Ursprunges sei.

Erinnern wir uns aber der Tatsache, daß eine vermehrte Ausscheidung von Substanzen aus der Gruppe der Oxyprotein-


Diazo-chromogen als Histidin berechnet
Gesamt Stickstoff gr.
Pro Tag
I
II
III
IV
V
VI
VII
VIII
Fig. 1.


Diazo-chromogen als Histidin berechnet
Gesamt Stickstoff gr
Pro Tag
I
II
III
IV
V
VI
VII
VIII
Fig. 2.

säuren überall dort beobachtet wird, wo es unter dem Einflusse toxischer Stoffwechselstörungen zu einem vermehrten Zerfall von Protoplasmaeiweiß kommt, so werden wir darin eine Stütze für die von M. Weiß anderweitig begründete Vermutung erblicken dürfen, daß auch das „Diazochromogen“ zu der Gruppe der Oxyproteinsäuren gehöre.

Zusammenfassung.

Die relative Menge eines im normalen Hundeharn vorkommenden, mit Diazosubstanzen unter Farbstoffbildung reagierenden Chromogens kann darin nach dem colorimetrischen Verfahren, das von M. Weiß und N. Ssobolew zur Auswertung des Histidins angegeben worden ist, geschätzt werden.

Die Ausscheidung des „Diazochromogens“ im Hundeharn erwies sich sowohl von der Menge der im Nahrungseiweiß enthaltenen Histidinkomplexe als auch von der Menge des im Carnosin der Fleischnahrung enthaltenen Histidins unabhängig.

Dagegen ergab sich ein inniger Zusammenhang zwischen der Ausscheidung des Diazochromogens und dem gleichzeitigen Gesamteiweißumsatz im Organismus, insofern die Kurven beider durchaus gleichsinnig verlaufen; doch ist dabei anscheinend das Nahrungseiweiß und das zerfallende Gewebseiweiß nicht gleichmäßig beteiligt und das Chromogen in erster Linie nicht sowohl exogenen als vielmehr endogenen Ursprunges.

Dieses Verhalten bildet eine Stütze der von M. Weiß anderweitig begründeten Annahme, daß auch das Diazochromogen des normalen Hundeharnes (ebenso wie das Diazochromogen des pathologischen Menschenharnes) zu der Gruppe der Oxyproteinsäuren gehören dürfte.

Über die Vergärung der Brenztraubensäure durch Bakterien. II.

Von

L. Karczag und L. Móczár.

(Aus dem II. Pathologisch-anatomischen Institut und aus dem Laboratorium der III. Medizinischen Klinik der Kgl. Universität zu Budapest.)

(Eingegangen am 1. Juni 1916.)

A.

In unserer ersten Mitteilung im Jahre 1913[1]) haben wir bereits darüber berichtet, daß die Brenztraubensäure, der Hauptrepräsentant der α-Ketosäuren, durch gewisse pathogene Bakterienarten unter lebhafter Gasbildung zerlegt wird.

Diese Wirkung der Bakterien spricht ebenfalls dafür, daß eine spezifisch-biologische Beziehung zwischen Brenztraubensäure und Traubenzucker besteht, da es sich aus den Experimenten ergab, daß die Veränderung der Brenztraubensäure und ihrer Alkalisalze unter Gasbildung nur durch diejenigen Bakterien bewirkt wurde, die ein Zerstörungsvermögen gegen Traubenzucker im gleichen Sinne besitzen. Als solche Brenztraubensäurevergärer erwiesen sich: Bact. coli, Bac. paratyphi B und Bac. enteritidis Gaertner, die mit wechselnder Energie eine stürmische Zerlegung der Brenztraubensäure und ihrer Alkalisalze bewirkten.

In Verfolgung dieser neuen Lebensphänomene der Mikroorganismen haben wir die Experimente systematisch weiter ausgebaut und zunächst eine neue Anzahl von pathogenen Bakterien zur Untersuchung herangezogen.

Wir haben dieselben Versuchsbedingungen eingehalten, wie diese bereits in unserer ersten Mitteilung geschildert wurden.

[1]) L. Karczag und L. Móczár, diese Zeitschr. 55, 79, 1913.

Als Kulturmedium diente uns eine sterile 0,2%ige Lösung von Brenztraubensäure bzw. ihrer Alkalisalze in zuckerfreier Nährbouillon, die dann mit den Reinkulturen folgender Bakterienarten geimpft worden ist:

1. Bac. typhi murium,
2. " pneumoniae,
3. " oedematis maligni,
4. " diphtheriae,
5. " pseudotubercul. rodentium,
6. " erysipel. suis,
7. Diplococcus lanceolatus.

Was die Einzelheiten dieser Untersuchungen betrifft, so möchten wir zunächst die Durchschnittszahlen der abgelesenen Gasmengen, die aus der Brenztraubensäurebouillon durch die Bakterien entwickelt wurden, in folgenden Tabellen zusammenstellen.

Tabelle I.

Probe	6–10 St.	10–24 St.	24–48 St.	48–72 St.	72–96 St.
Brenztraubensäure-bouillon + Bac. typhi mur.	1/4–3	3–4	4–4,5	—	—
Pneumon.	Sp.–0,5	0,5–1,5	1,5–2	—	—
Oedem. mal. . . .	—	—	Sp.	0,5	0,5–1,5
Diphtheriae . . .	0	0	0	0	0
Pseudotub. rodent.	0	0	0	0	0
Erysip. suis . . .	0	0	0	0	0
Diploc. lanc. . . .	0	0	0	0	0

In folgender Tabelle II sind die Zahlen veranschaulicht, die den abgelesenen Gasmengen, die aus einer 0,2%igen Lösung von brenztraubensaurem Kalium in Bouillon entwickelt wurden, entsprechen.

Tabelle II.

Probe	6–10 St.	10–24 St.	24–48 St.	48–72 St.	72–96 St.
Brenztraubensaures Kali + Bouillon + Bac. typhi mur.	0,5–1,5	1,5–4	4,0–4,5	—	—
Pneumon.	Sp.–0,5	0,5–2	—	—	—
Oedem. mal. . . .	—	—	Sp.–0,5	0,5–1	1–1,5
Diphtheriae . . .	0	0	0	0	0
Pseudotub. rodent.	0	0	0	0	0
Erysip. suis . . .	0	0	0	0	0
Diploc. lanc. . . .	0	0	0	0	0

Die Resultate dieser Versuchsreihe stimmen im allgemeinen mit denen der Brenztraubensäure (Tabelle I) überein, es wurden weder größere noch kleinere Ausschläge beobachtet.

Über die einzelnen Bakterien möchten wir folgendes bemerken.

Bac. typhi murium.

Dieser Bacillus ist ein sehr energischer Brenztraubensäurevergärer. Nur Bact. coli und Paratyphus B vermochten die Brenztraubensäure mit derselben Energie anzugreifen wie der Mäusetyphusbacillus. Die Inkubationszeit beträgt 6 bis 8 Stunden. Die Proben sind nach 24 Stunden praktisch ausgegoren.

Bac. pneumoniae.

Die Gärungen verlaufen ziemlich langsam. Eine vollständige Vergärung wurde nur selten und nach mehrtägigem Stehenlassen bewirkt. Die Geschwindigkeit der Gasabspaltung und die entwickelten Gasmengen lassen deutlich erkennen, daß dieser Bacillus einer der schwächsten Brenztraubensäurevergärer ist. Bezüglich seiner Gärungsenergie kommt er nach dem Gaertnerschen Bacillus.

Bac. oedematis maligni.

Die Inkubationszeit beträgt im allgemeinen 2 bis 3 Tage, was wir seiner anaeroben Natur zuschreiben möchten und seiner langsamen Entwicklung. Die Proben rochen selbst nach 6 tägigem Stehenlassen nicht. Wir überzeugten uns auch durch die bakteriologische Untersuchung des Gärgutes davon, daß eine Infektion mit Fäulnisbacillen nicht vorhanden war.

Zusammenfassung.

Durch die vorliegende Untersuchung erkannten wir somit als Brenztraubensäurevergärer: Bac. typhi murium, Bac. pneum. Friedlaender und Bac. oedem. maligni, die bekannte Traubenzuckervergärer sind, und erbrachten den weiteren Beweis dafür, daß die Brenztraubensäure nur von zuckerspaltenden Bakterien verbraucht und zerlegt wurde; dieses deutet auf das Bestehen einer spezifisch-biologischen Beziehung zwischen Brenztraubensäure und Traubenzucker hin, die von Neuberg und Karczag 1911 durch das Studium der zuckerfreien Gärung begründet worden ist.

Über die Vergärung der Brenztraubensäure durch Bakterien. III.

Von

L. Karczag und Else Breuer.

(Aus dem Laboratorium der III. Medizinischen Klinik der Kgl. Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 1. Juni 1915.)

Wir haben bereits in unserer ersten Mitteilung[1]) darauf hingewiesen, daß die Brenztraubensäure durch Bakterien eine Veränderung erleidet, die sowohl biologisch wie chemisch von der Hefegärung dieser Substanz zu unterscheiden ist. Trotz der verschiedenen Richtung und Ablauf der Gärungsprozesse besteht jedoch zwischen beiden eine äußerliche Analogie.

Wir haben in der vorliegenden Mitteilung festzustellen gesucht, wie weit sich die Analogie zwischen Hefegärung und Bakteriengärung erstreckt, und haben eine Anzahl chemischer Substanzen, die nach Neuberg und Karczag[2]) mit besonderer Leichtigkeit der zuckerfreien Hefegärung unterliegen, mit Bakterien in Berührung gebracht und unsere Studien bezüglich der Eigenschaft der Bakterien, Moleküle von bestimmter Konstitution unter Gasbildung zu sprengen, weiter ausgebaut.

Oxalessigsäure. $COOH—CH_2—CO—COOH$.

Die Oxalessigsäure wird durch die Hefe nach der von Neuberg und Karczag erwiesenen Gleichung:

$$COOH—CH_2—CO—COOH = 2\,CO_2 + CH_3—COH$$

glatt in Kohlensäure und Acetaldehyd gespalten[3]). Der Angriff der Säure verläuft nur etwas schwächer wie der der

---

[1]) L. Karczag und L. Móczár, diese Zeitschr. **55**, 79, 1913.

[2]) C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. **37**, 170, 1911.

[3]) C. Neuberg und L. Karczag, diese Zeitschr. **36**, 68, 1911.

Brenztraubensäure, welche eine sehr schnelle und beträchtliche ist, und nicht hinter der von Glucose zurückbleibt[1]).

Wir haben 0,1 bis 0,2 $^0/_0$ ige Lösungen der Oxalessigsäure bzw. ihrer Alkalisalze in Bouillon mit 24 stündigen Kulturen folgender Bakterien geimpft:

1. Bact. coli,
2. " paratyphi B,
3. " dysent. Flexner,
4. " " Strong,
5. " " Yes,
6. " enteritidis Gaertner,
7. " typhi murium,
8. Streptococcus.

Es ließ sich fast ausnahmslos eine Vermehrung der Bakterien in der Kulturflüssigkeit beobachten, die sich in einer schwachen bis starken Trübung oder Sedimentierung der Bakterien kund gab.

In den mit Bact. coli, Paratyphi B, Enteritidis, Typhi murium angestellten Proben, ließ sich nach einer 7 bis 12 stündigen Inkubation eine minimale Gasentwicklung bemerken. Die entwickelten Gasmengen erreichten nur kaum das Volumen von 0,5 ccm. Ein mehrtägiges Stehenlassen der Proben war auf die Gasproduktion ohne Einfluß.

Merkwürdigerweise sahen wir in mehreren Proben von Bact. dysent. Flexner Spuren von Gasmengen sich entwickeln.

Diese Experimente lehrten also, daß die Oxalessigsäure von den Brenztraubensäure vergärenden Bakterien nur äußerst schwer angegriffen wird, bzw. daß nur minimale Substanzmengen in Gärung geraten.

Im Gegensatz zur Hefe, welche die Brenztraubensäure und die Oxalessigsäure fast mit der gleichen Energie vergärt, bewirken somit die Bakterien nur den Abbau der dreiatomigen Kohlenstoffkette, bzw. die der Brenztraubensäure, während die vieratomige der Oxalessigsäure fast unberührt zu bleiben scheint.

Es ist ferner die Tatsache interessant, daß die Oxalessigsäure durch Bakterien der Coligruppe eine kaum sichtbare Gärung erleidet, wogegen die Fäulnisbakterien eine solche bewirken. —

---

[1]) C. Neuberg und L. Karczag, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **44**, 2477.

Neuberg[1]) fand nämlich, daß die Brenztraubensäure und Oxalessigsäure durch Fäulnisbakterien glatt abgebaut werden. — Hierbei war aber auch nicht zu verkennen, daß die Oxalessigsäure schwerer angegriffen wurde wie die Brenztraubensäure, was auch daraus hervorging, daß die Gasentwicklung hierbei auch weit geringer war wie bei der Fäulnis der Brenztraubensäure; sie zog sich auch längere Zeit hin.

Wenn wir den Umstand ins Auge fassen, daß die Vergärung der Brenztraubensäure durch Colibacillen zu anderen chemischen Produkten führt wie durch die Fäulniserreger, so müssen wir mit Neuberg die Anschauung vertreten, daß ein Gärungsprozeß, der mit den phylogenetisch älteren, kohlenhydratzehrenden Bakterien verläuft, ein durchaus anderer ist als derjenige, der mit den jüngeren, eiweiß-angepaßten Fäulnisbakterien abläuft.

Wir möchten jedoch hervorheben, daß aus unseren Experimenten nur die Tatsache hervorgeht, daß die Oxalessigsäure nicht unter Gasabspaltung vergoren wird. Eine Gärung dieser Substanz ohne Produktion von gasförmigen Stoffen, also eine unsichtbar verlaufende Gärung bzw. Veränderung kann allerdings stattfinden, scheint sogar nach unseren Beobachtungen sehr wahrscheinlich zu sein.

Phenylbrenztraubensäure.

$C_6H_5—CH_2—CO—COOH$.

Die Phenylbrenztraubensäure gehört ebenfalls zu denjenigen Substanzen, die durch die Hefe leicht unter Gasabspaltung zerlegt werden. Zwecks Untersuchung der Bakteriengärung dieser Substanz haben wir sowohl die freie Säure wie die Alkalisalze in 0,1 bis 0,2 $^0/_0$igen Lösungen in Nährbouillon mit den oben bei der Oxalessigsäure aufgezählten Bakterien in Berührung gebracht.

Bezüglich dieser Substanz ergab sich aus den angestellten Experimenten im wesentlichen das gleiche Resultat wie bei der Oxalessigsäure. Auch hierbei beobachteten wir bei allen Bakterien das Gedeihen der Kulturen sowie eine Ansammlung von geringen Gasmengen nach einer 7 bis 12 stündigen Inkubation bei Coli, Paratyphus B, Typhi murium und Flexnerbacillus.

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 67, 90, 1914.

Chelidonsäure (Acetondioxalsäureanhydrid).

$$CO\left\langle\begin{matrix}CH:C—COOH\\ \\CH:C—COOH\end{matrix}\right.\!\!>O\,.$$

Über die Vergärung dieser Substanz durch Hefe siehe die oben zitierte Arbeit von N. und K.

Wir untersuchten 0,1 bis 0,2 %ige Lösungen in Bouillon mit

1. Bact. coli,
2. „ paratyphi B,
3. „ enterit. Gaertner,
4. „ typhi.

Keine dieser Bakterien vermochte die Chelidonsäure zu zerlegen, trotzdem auch hier meistens ein üppiges Wachstum der Bakterien zu beobachten war.

Acetondicarbonsäure (β-Ketoglutarsäure).

$$COOH—CH_2—CO—CH_2—COOH.$$

Diese Substanz, die durch Hefe eine beträchtliche Menge CO_2 abspaltet, verhielt sich gegen die gleichen Bakterien wie die Chelidonsäure.

Acetylendicarbonsäure. $COOH—C\equiv C—COOH$.

Eine Gärung unter Abspaltung von Gas wurde durch die Bakterien Coli, Paratyphi, Enteritidis, Typhi in 0,1 bis 0,2 %igen Lösungen in Bouillon nicht beobachtet. Die Bakterien zeigten kein Wachstum in diesem Kulturmedium.

Wie aus der Strukturformel der Acetylendicarbonsäure ersichtlich ist, enthält diese Säure keine Ketogruppe im Molekül, wogegen die anderen von uns geprüften Substanzen zu den Ketosäuren gehören. Die Beobachtung, daß in der Acetylendicarbonsäurebouillon, im Gegensatz zu anderen Ketosäurebouillons, keine Vergärung der Bakterien stattfand, führte uns zu der Annahme, daß die Ketosäuren vermöge ihrer spezifischen Molekularkonstitution Stoffe sind, die von den Bakterien leicht assimiliert bzw. zersetzt werden. Wir haben deshalb eine Reihe von Versuchen mit Essigsäure, Buttersäure, Valeriansäure angestellt, indem wir diese in 0,1 bis 0,2 %ige Lösungen mit Coli-, Paratyphi-, Enteritidis- und Typhusbacillen ge-

impft bzw. zur Gärung angesetzt haben. Keine der Proben zeigte eine Gärung, und in keiner der Proben ließ sich die Vermehrung der Bakterien wahrnehmen. Es scheint also die Annahme berechtigt, daß die Ketogruppe im Molekül ein prädisponierendes Moment für die Verwertung desselben bei vitalen Prozessen der Mikroorganismen darstellt.

Zusammenfassung.

Das Ergebnis unserer Untersuchungen möchten wir in folgenden allgemeinen Schluss zusammenfassen: Im Gegensatz zur Hefe und den saprophitischen Fäulnisbacillen, welche die Moleküle der verschiedensten, vornehmlich α-Ketosäuren leicht unter Gasabspaltung zu sprengen imstande sind, greifen bestimmte pathogene Bakterienarten, welche den Hauptrepräsentanten der α-Ketosäuren, die Brenztraubensäure, spalten, die höheren Glieder der α-Ketosäuren sowie Ketosäuren in anderer Konstitution entweder gar nicht an, oder äußerst schwer unter Gasbildung.

Über die Vergärung der Brenztraubensäure durch Bakterien. IV.

Von

L. Karczag und E. Schiff.

(Aus dem Laboratorium der III. Medizinischen Klinik der Kgl. Universität zu Budapest.)

(Eingegangen am 1. Juni 1915.)

I.

Über die sich abspielenden chemischen Vorgänge bei der Vergärung der Brenztraubensäure durch Bact. coli wurde bereits von Karczag und Móczár[1]) kurz berichtet.

Das völlige Fehlen von Acetaldehyd unter den Gärungsprodukten sowie das Vorhandensein von großen Mengen Wasserstoffs (bis ca. 90%) in den Gärungsgasen ließen zunächst erkennen, daß die Bakteriengärung der Brenztraubensäure nach einer Gleichung erfolgt, die von der der Hefegärung dieser Substanz wohl zu unterscheiden ist, da letztere bekanntlich im Sinne der Gleichung[2])

$$CH_3COCOOH = CH_3COH + CO_2$$

zu Acetaldehyd und Kohlensäure führt.

Es ist uns damals nicht gelungen, ein charakteristisches Produkt, das geeignet wäre, über die Natur des Gärungsvorganges ein einheitliches Bild zu liefern, aufzufinden.

Wir haben die diesbezüglichen Gärungsversuche weiter fortgesetzt. Es standen uns experimentelle Schwierigkeiten in Wege, da der Angriff der Brenztraubensäure durch Bakterien bzw. durch Bact. coli nur dann erfolgt, falls Bouillon als Nährsubstrat verwendet wird.

Unsere Versuche, die Brenztraubensäure in einfachen und einheitlich zusammengesetzten Nährböden, wie Peptonnährböden, anorg. Nährböden nach Fraenkel, Uschinsky, durch Coli zu vergären, schlugen fehl, weshalb wir die Versuche doch unter Anwendung von Nährbouillon als Kulturmedium vornehmen mußten. Da die Zusammensetzung der Nährbouillon

---

[1]) L. Karczag und Móczár, diese Zeitschr. 55, 79, 1913.

[2]) C. Neuberg u. L. Karczag, diese Zeitschr. 36, 68, 1911.

an flüchtigen Fettsäuren keine konstante ist, so haben wir diese vor ihrer Anwendung einer chemischen Analyse unterworfen, sodann entsprechende Mengen mit Brenztraubensäure versetzt, mit einer Emulsion von einer 24 stündigen Kultur gärkräftiger Coli infiziert, und das Gärgut nach Ablauf einer bestimmten Frist (bis die Gasentwicklung vollständig aufgehört hatte) einer Analyse unterworfen, wobei der gleiche Gang befolgt wurde wie bei der Analyse der Standardbouillon.

Die chemische Untersuchung erstreckte sich auf die quantitative Bestimmung der Ameisensäure, Butter- und Propionsäure sowie der entwickelten Kohlensäure. Die Essigsäure wurde nicht bestimmt, da diese sowohl in normaler Bouillon wie im Gärgute nur in Spuren — in quantitativ nicht bestimmbaren Mengen — nachzuweisen war.

Die Ameisensäurebestimmung.

Über den Gang der chemischen Untersuchung möchten wir kurz bemerken, daß wir das zu untersuchende Material in üblicher Weise im Dampfstrom destilliert haben, sodann das Destillat mit $^{n}/_{10}$-Natronlauge neutralisiert, eingedampft, den Rückstand umkrystallisiert und die Ameisensäure nach H. Fincke[1]) bestimmt haben.

Versuch A und B umfaßt die Analyse der Normalbouillon und der Brenztraubensäurebouillon, welch letztere in der oben angegebenen Weise mit Coli geimpft und nach 8 tägigem Stehenlassen im Brutschranke untersucht wurde. Um die bei der Gärung entwickelte Kohlensäure gleichzeitig zu bestimmen, haben wir den Gärungskolben mit einem zweiten Kolben verbunden, in dem sich eine titrierte Barytlösung befand. Nach Ablauf des Gärungsprozesses wurde dann die Barytlösung zurücktitriert.

Versuch A.

I. Normalbouillon.

800 ccm Bouillon wurden nach Ansäuern mit H_2SO_4 destilliert; zur Neutralisation des Destillates wurden 211 $^{n}/_{10}$-NaOH verbraucht; nach Eindampfen des neutralisierten Destillates wurden 2,14 g fettsaures Salz erhalten; 0,5 g durch Alkoholextraktion von anorg. Salz befreites und umkrystallisiertes Salz gaben 0,2758 g HgCl.

[1]) H. Fincke, diese Zeitschr. 51, 253, 1913.

Demnach enthält das Salz 5,37 % Ameisensäure.

II. Brenztraubensäurebouillon.

In einer Vorprobe haben wir uns über die optimale Konzentration an Brenztraubensäure, bzw. über die Gärkraft unseres Colistammes orientiert. Es ergab sich, daß die 24 stündige Kultur von Coli bei einer Konzentration von 0,2 % Brenztraubensäure am energischsten vergärt; so wurde im Schrötterschen Gärungsröhrchen nach 4,5 Stunden 1 ccm, nach 20 Stunden 4 ccm Gas entwickelt.

Demnach wurde 1 l Bouillon mit 20 ccm Brenztraubensäure versetzt und mit einer Emulsion einer 24 stündigen Kultur von gärkräftigem Coli infiziert. In den ersten Tagen war die Gasabspaltung eine fast stürmische. Nach 8 tägigem Stehenlassen im Brutschranke gab eine abgegossene Probe der Gärflüssigkeit keine Brenztraubensäure-Reaktion.

Die Rücktitration des Baryts ergab, daß 4,86 g CO_2 entwickelt wurden.

1000 ccm Gärgut wurden nach Ansäuern mit H_2SO_4 destilliert; das Destillat verbrauchte zur Neutralisation 357,3 ccm NaOH; nach Eindampfen des neutralisierten Destillates wurden 2,53 g fettsaures Salz erhalten; 0,1372 g durch Alkoholextraktion von Kochsalz befreites und umkrystallisiertes Salz lieferten 0,0336 g HgCl.

Das Salz enthielt somit 2,38 % Ameisensäure.

Versuch B.

I. Normalbouillon.

1 Liter Bouillon wurde in üblicher Weise destilliert, das Destillat mit 134,4 ccm $^n/_{10}$-NaOH neutralisiert, eingedampft und gewogen. Erhalten wurden 0,944 g fettsaures Salz. Nach Alkoholextraktion und Umkrystallisieren wurden 0,55 g abgewogen und zur Ameisensäurebestimmung verwendet. Die Substanz lieferte 0,4786 g HgCl.

Demnach enthielt das Salz 8,5 % Ameisensäure.

II. Brenztraubensäurebouillon.

1 Liter 0,2 % ige Brenztraubensäurebouillon wurde zur Gärung, wie sub Versuch A II angegeben, angesetzt.

Die Rücktitration der Barytlösung ergab, daß bei der Gärung 10,99 ccm CO_2 gleich 0,218 g CO_2 entwickelt wurden.

1 Liter Gärgut wurde destilliert; das Destillat verbrauchte 288,4 g $^n/_{10}$-NaOH; nach Eindampfen der neutralisierten Lösung wurden 1,87 g fettsaures Salz erhalten; 0,4200 g durch Alkoholextraktion und Umkrystallisieren gereinigtes Salz gaben 0,0255 g HgCl. Demnach enthielt das fettsaure Salz 0,58$^0/_0$ Ameisensäure.

Im Versuch A enthielt das fettsaure Salz der Normalbouillon 5,37$^0/_0$ Ameisensäure und das der vergorenen Brenztraubensäurebouillon 2,38$^0/_0$ Ameisensäure. Im Versuch B wurden in den fettsauren Salzen der Normalbouillon 8,8$^0/_0$ Ameisensäure nachgewiesen, in denjenigen des Gärgutes der Brenztraubensäure 0,58$^0/_0$ Ameisensäure.

Über die Herkunft der Formiate in der normalen Nährbouillon sind wir nicht im klaren, möglicherweise stammen obige Spuren von Formiaten sekundär aus den Eiweißstoffen, oder sie entstehen bei der Dampfdestillation in Gegenwart von Schwefelsäure.

Außer den angeführten Analysen wurden noch einige andere ausgeführt, die übereinstimmend ergaben, daß im Destillat der normalen Nährbouillon Formiate in wechselnder Menge vorhanden sind.

In beiden oben angeführten Versuchen war nach der Vergärung eine ausgesprochene Abnahme der Ameisensäure in der Brenztraubensäurebouillon nachweisbar.

Butter- und Propionsäurebestimmung.

In unserer ersten Mitteilung haben wir die Anwesenheit von einem Gemisch von Butyraten und Propionaten im Destillat des Brenztraubensäuregärgutes nachgewiesen. Unsere Analysen, die sich auf die Zusammensetzung der normalen Nährbouillons bezogen, ergaben, daß diese Fettsäuren in der normalen Bouillon ebenfalls vorhanden bzw. präformiert sind. Wir versuchten die quantitativen Verhältnisse analytisch durchzuführen. Die Bestimmungen geschahen nach der Methode von Brasch und Neuberg[1]), die die Ameisensäure und ihre Homologen zu ermitteln gestattet. Wir erhielten leider sehr schwankende Vergleichswerte, was vielleicht damit zusammenhängen dürfte, daß zur Analyse nur geringe Substanzmengen verwendet worden sind.

---

[1]) W. Brasch u. C. Neuberg, diese Zeitschr. 13, 299, 1908.

Obzwar es uns derzeit wegen Kostspieligkeit des Materials und der experimentellen Schwierigkeit seiner Verarbeitung nicht geglückt ist, die Vergleichsbestimmungen exakt durchzuführen, so sprechen rechnerische Beweise dafür, daß das Plus an flüchtigen Fettsäuren, das sich aus den sub Versuch A und B angegebenen Zahlen berechnen läßt, ein so geringfügiges ist, daß diese keinesfalls als Hauptumwandlungsprodukte der ablaufenden Brenztraubensäuregärung anzusehen sind.

Die dem absoluten Werte nach fast minimal zu betrachtende Zunahme an Butyrat-Propionat möchten wir vielmehr sekundären Umwandlungsprozessen zuschreiben.

II.

Das Hauptergebnis vorliegender Versuche war der Nachweis, daß die Ameisensäure und Essigsäure während des Gärungsprozesses nicht entstehen, daß die Butter- und Propionsäure sich in der Nährbouillon präformiert vorfinden und daß sie nicht als primäre Umwandlungsprodukte der Brenztraubensäure anzusehen sind. Dieses Ergebnis ist auch deshalb von biologischem Interesse, da Neuberg[1]) in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit über die Fäulnis von Brenztraubensäure und Oxalessigsäure festgestellt hatte, daß bei der Einwirkung von Fäulniserregern auf diese Substanzen als Hauptprodukt die Essigsäure (bis 50%) und als Nebenprodukt eine nicht unbeträchtliche Menge von Ameisensäure (bis 22%) entsteht.

Alle unsere experimentellen Resultate über die Einwirkung von B. coli auf die Brenztraubensäure sprechen dafür, daß hierbei sich ein Umwandlungsprozeß abspielt, der quantitativ zu gasförmigen Produkten führt. Da die Ameisensäure im Gärgute nicht nachzuweisen war, supponierten wir, daß die Ameisensäure als intermediäres Glied entsteht und sofort unter Gasproduktion quantitativ weiter zerstört wird. Um die Richtigkeit unserer Annahme zu prüfen, haben wir in einer Reihe von Experimenten versucht, die freie Ameisensäure durch eine Anzahl von Brenztraubensäure vergärenden Bakterien (B. coli, Paratyphi B, Enterit. Gaertner, Typhi murium) zu zerstören.

Eine Untersuchungsreihe, die mit Frl. Dr. Breuer angestellt wurde, zeigte folgendes Resultat:

[1]) C. Neuberg, diese Zeitschr. 67, 590, 1914.

Probe	Nach 12 St.	Nach 18 St.	Nach 24 St.	Nach 48 St.
1. 0,1 %ige Ameisensäurebouillon + B. coli . .	2,0	2,5	3,0	—
2. 0,1 %ige Ameisensäurebouillon + Paratyph. B	2,0	2,0	2,5	—
3. 0,1 %ige Ameisensäurebouillon + Ent. Gaertn.	0,5	1,5	2,0	2,0
4. 0,1 %ige Ameisensäurebouillon + Typhi mur.	Sp.	1,0	1,5	1,5
Kontrollen zu 1. bis 4. . .	0	0	0	0

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, wurde durch die Bakterien aus Ameisensäure eine nicht unbeträchtliche Menge Gas abgespalten und somit der Nachweis erbracht, daß die Gasbildner der Brenztraubensäure vergärenden Bakterien die Fähigkeit besitzen, die Ameisensäure zu zerstören.

Bei der Durchsicht der Literatur fanden wir eine Anzahl von Arbeiten vor, die sich auf die Vergärung der Ameisensäure beziehen.

Omielansky[1]) fand, daß Natriumformiat durch Bact. formicum nach der Formel

$$2(NaHCO_2 + H_2O) = Na_2CO_3 + H_2O + CO_2 + 2H_2$$

vergoren wird.

Pakes und Jollyman[2]) haben gezeigt, daß B. coli, B. pneumoniae und Enteritidis die Ameisensäure ebenfalls unter Gasbildung vergären.

Wir wurden somit durch das biologische Verhalten der Bakterien gegen die Ameisensäure in unserer Hypothese bekräftigt, daß diese Substanz als intermediäres Umwandlungsprodukt bei der Vergärung der Brenztraubensäure auftritt. Der genetische Zusammenhang zwischen Brenztraubensäure und Ameisensäure würde auch ein Licht in ein verwandtes Gebiet, in die Wasserstoffgärung der Kohlenhydrate, werfen. Wir erwähnen hierbei die von Frankland und Harden vertretene Ansicht, daß bei der Bakteriengärung des Zuckers als intermediäres Produkt die Ameisensäure auftritt, die als die wesentlichste Quelle der Gasbildung anzunehmen ist.

Eine weitere Frage, die wir zunächst einer weiteren biologischen Prüfung unterworfen haben, war: Wie entsteht die Ameisensäure aus der Brenztraubensäure?

Das massenhafte Auftreten von Wasserstoff unter den Gärungsgasen der Brenztraubensäure ließ uns vermuten, daß

[1]) Omielansky, Zentr. Bakt. 2. Abt. 11, 1903.
[2]) Pakes und Jollyman, Journ. chem. soc. 1901.

dieser nicht ausschließlich und direkt aus der Brenztraubensäure abgespalten wird, sondern auch aus dem Wasser, das vorher an eine der intermediär gebildeten Substanzen angelagert wird.

Den Übergang von Brenztraubensäure in Ameisensäure und Essigsäure hat bereits Neuberg[1]) bei der Fäulnis festgestellt und durch folgende Gleichung veranschaulicht:

$$\begin{matrix} CH_3.CO & & OH & & CH_3COOH \\ | & + & | & = & + \\ COOH & & H & & HCOOH \end{matrix}$$

Wenn wir nun annehmen, daß die Essigsäure 1 Molekül Wasser unter Abspaltung von Wasserstoff anlagert, so würde die Glykolsäure entstehen

$$\begin{matrix} CH_3 & & OH & & CH_2OH & \\ | & + & | & = & | & + H_2. \\ COOH & & H & & COOH & \end{matrix}$$

Wir haben 0,1 $^0/_0$ige Lösungen von Essigsäure und Glykolsäure in Bouillon mit Bact. coli in den Schrötterschen Gärungsröhrchen zur Gärung angesetzt. Keine der Proben ließ eine Gärung wahrnehmen, und das Wachstum der Bakterien unterblieb in diesen Flüssigkeiten. Wir benutzten nun, auf einer Mitteilung von Oppenheimer[2]) fußend, einen Kunstgriff, um diese Substanzen zur Gärung zu bringen, und setzten zu unseren Proben Spuren von Brenztraubensäure. Nach Impfung mit B. coli zeigte die Essigsäure nach 72stündigem Stehenlassen keine Gasabspaltung; die Glykolsäure dagegen geriet in Gärung und zeigte nach 18 Stunden 1 ccm Gas an, das durch Kalilauge nicht absorbiert wurde. Die Experimente wurden mehrmals wiederholt, und es zeigte sich übereinstimmend, daß die Glykolsäure bei Anwesenheit von Brenztraubensäure vergoren wird.

Hiernach scheint unsere Annahme, daß als weiteres Zwischenglied die Glykolsäure entsteht, an Wahrscheinlichkeit zu gewinnen. Da wir aber die Essigsäure nicht zur Gärung bringen konnten, so nehmen wir an, daß die Entstehung der Glykolsäure aus der Brenztraubensäure nicht so einfach verläuft, wie dies durch die obenstehende Formel wiedergegeben ist.

---

[1]) Neuberg, l. c.

[2]) Oppenheimer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 93, 235.

Die Ameisensäure dürfte aus der Glykolsäure in einer Weise hervorgegangen sein, die wir durch folgendes Schema veranschaulichen möchten:

$$\underset{\text{Glykolsäure}}{\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ COOH \end{matrix}} + H_2 = \underset{\text{Glykolaldehyd}}{\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ C\genfrac{}{}{0pt}{}{\nearrow O}{\searrow H} \end{matrix}} + H_2O$$

$$\downarrow$$

$$\begin{matrix} CH_2OH \\ | \\ C\genfrac{}{}{0pt}{}{\nearrow O}{\searrow H} \end{matrix} = \underset{\text{Formaldehyd}}{\begin{matrix} HCOH \\ \\ HCOH \end{matrix}}$$

$$\downarrow$$

$$\begin{matrix} HCOH \\ \\ HCOH \end{matrix} + 2\,H_2O = \underset{\text{Ameisensäure}}{\begin{matrix} HCOOH \\ \\ HCOOH \end{matrix}} + 2\,H_2$$

$$\downarrow$$

$$2\,HCOOH = 2\,CO_2 + 2\,H_2.$$

Zusammenfassung.

1. Die Brenztraubensäure erfährt durch Bact. coli einen Abbau, der über eine Anzahl intermediär gebildeter Substanzen fast quantitativ zu gasförmigen Produkten führt.

2. Die Gärungsgase bestehen bis ca. 90 % aus Wasserstoff und bis ca. 10 % aus Kohlensäure.

3. Unter den intermediär gebildeten Substanzen sind die Ameisensäure und die Essigsäure nicht nachweisbar. Die geringe Zunahme von Butter- und Propionsäure ist auf sekundäre Prozesse zurückzuführen.

4. Es wurde gezeigt, daß sowohl die Ameisensäure wie die Glykolsäure durch eine Anzahl von Brenztraubensäure vergärenden Bakterien (B. coli, Paratyphi B, Enteritidis Gaertner, Typhi murium, Pneumoniae) eine Wasserstoffgärung erleidet.

5. Diese spezifisch-biologischen Beziehungen sprechen für einen genetischen Zusammenhang von Brenztraubensäure mit Glykolsäure und Ameisensäure, die wir als intermediär gebildete Glieder der Brenztraubensäuregärung ansehen möchten.

Über die Anwendung von Borax- und Borsäurelösungen bei der colorimetrischen Messung der Wasserstoffionenkonzentration des Meerwassers[1].

Von

Sven Palitzsch.

(Aus dem Carlsberg Laboratorium, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 14. Mai 1915.)

Die von S. P. L. Sörensen und Sven Palitzsch ausgearbeitete und früher beschriebene[2]) colorimetrische Methode zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration des Meerwassers beruht auf einer Vergleichung der durch Zusatz eines geeigneten Indikators zu einer Probe des Meerwassers und andererseits zu einer Reihe Lösungen, deren Wasserstoffionenkonzentrationen stufenweise variieren und vorher gemessen sind, zum Vorschein kommenden Farbennuancen. Die als solche Vergleichsflüssigkeiten dienenden Mischungen von Lösungen von Natriumborat und Salzsäure sowie von sekundärem und primärem Phosphat haben sich bisher sehr gut bewährt; erst als Herr Professor Roald Amundsen die Methode auf seiner geplanten, vierjährigen Expedition nach den Meeren in der Nähe des Nordpols zu benutzen wünschte, und es daher notwendig wurde, die Stammlösungen an Bord eines Schiffes herstellen zu können, traten hierbei verschiedene Schwierigkeiten an den Tag, namentlich in betreff der Boratlösung, da für diese eine kohlensäurefreie Natriumhydroxydlösung von genauer Stärke anzuwenden ist. Sowohl die Aufbewahrung einer solchen Lösung wie eine Herstellung davon an Bord würde so viele Beschwerde verursachen, daß es sehr erwünscht wurde, andere und für diese speziellen Verhältnisse besser geeignete Vergleichsmischungen zu finden.

---

[1]) Wird gleichzeitig in französischer Sprache in den Comptes rendus du Lab. de Carlsberg **11**, 199, 1915 veröffentlicht.

[2]) Diese Zeitschr. **24**, 387, 1910; **37**, 121, 1911; **51**, 307, 1913.

Es kam nun darauf an, ein paar am liebsten feste Stoffe zu finden, die sich genau abwägen und sich in gewöhnlichen Glasflaschen längere Zeit hindurch unverändert aufbewahren ließen, und die man durch Lösung und Verdünnung auf ein bestimmtes Volumen fertig zum Gebrauch machen könnte. Selbstverständlich mußten diese Stoffe auch den an alle Standardsubstanzen zu stellenden Forderungen genügen, nämlich daß sie ohne zu große Mühe hinlänglich rein herzustellen wären, ferner daß die Reinheit nicht zu schwer kontrollierbar wäre, und endlich in diesem speziellen Falle, daß die Mischungen der Lösungen dieser Stoffe als „Puffer“ bei den den zu untersuchenden Bereich umfassenden Wasserstoffionenkonzentrationen wirken sollen, und daß die Wasserstoffionenkonzentrationen sowohl durch die elektrometrische als durch die colorimetrische Methode sich zuverlässig und genau messen ließen.

Alle diese Bedingungen erfüllen nun Borax ($Na_2B_4O_7$, $10H_2O$) und Borsäure, und beide bieten außerdem den Vorteil, daß sie in sehr reinem Zustand erhältlich sind.

Bezüglich der Borsäure ist die Anwendbarkeit und der erforderliche Reinheitsgrad schon untersucht und beschrieben von S. P. L. Sörensen[1]), der diese Säure zur Darstellung der obengenannten Boratmischungen benutzte.

In betreff des Borax kann man es auch ohne Schwierigkeiten sehr rein und sogar mit der richtigen Zusammensetzung darstellen, trotzdem es bei gewöhnlicher Temperatur und Feuchtigkeit mit zehn Molekülen Wasser kristallisiert; der Borax ist sogar so luftbeständig und erhält durch Umkristallisierung so leicht den genauen Wassergehalt, daß er bekanntlich sich als Urtitersubstanz anwenden läßt, wenn die Genauigkeitsforderungen nicht zu groß sind.

Um zu erfahren, welche Handelswaren zur Darstellung der Vergleichsflüssigkeiten geeignet waren, wurden „Borax mit Garantieschein“ und „Borax zur Analyse“, beide von C. A. F. Kahlbaum, Berlin, sowie ein „chemisch reiner“ Borax, bezeichnet I, und außerdem noch zweimal umkristallisierte Proben der letztgenannten zwei Präparate untersucht.

50 g Borax wurden in 50 ccm heißem Wasser gelöst, dann filtriert

---

[1]) Diese Zeitschr. **21**, 172, 1909.

und unter Umrühren schnell abgekühlt; die Kristalle wurden abgenutscht und an der Luft auf Filtrierpapier getrocknet.

Die qualitativen Reinheitsprüfungen wurden in 5 %igen Lösungen angestellt; keines der fünf Präparate gab die geringste Reaktion in bezug auf Kohlensäure, Schwefelsäure noch Calcium; bei der Prüfung auf Eisen mittels Kaliumrhodanid und auf Stoffe, die von Schwefelwasserstoff gefällt werden, trat nur ein außerst schwacher roter bzw. brauner Schein hervor; durch Zusatz von Silbernitrat und Salpetersäure wurde nur die Lösung von Borax I deutlich opalescent, wogegen die Trübung der übrigen Lösungen kaum zu erkennen war; übrigens schadet ein geringer Gehalt an Chlorid nicht, wenn nur die Menge nicht so groß ist, daß sie sich bei der quantitativen Bestimmung der Hauptbestandteile des Borax zu bemerkbar macht.

Die Basenmenge wurde durch Titrierung mit Salzsäure und mit Methylrot als Indikator bestimmt. Methylrot, das einen viel deutlicheren Umschlag als das gewöhnlich benutzte Methylorange gibt, ändert nämlich seine Farbe bei einer Wasserstoffionenkonzentration, bei der die Borsäure in so geringem Grad dissoziiert ist, daß die Menge dieser Säure keinen merkbaren Einfluß auf das Titrierungsresultat ausübt.

Die Titrierung wurde in einer in bezug auf den Borax $^m/_{20}$-Lösung ausgeführt; in dieser wird die Base $^n/_{10}$, so daß 25 ccm reine Boraxlösung 25 ccm $^n/_{10}$-Salzsäure entsprechen werden; mit einer Genauigkeit von mindestens $^1/_{1000}$ war dies auch der Fall bei vier der fünf untersuchten Boraxproben; nur Borax I brauchte 0,35 ccm $^n/_{10}$-Salzsäure zu viel. Ein Fehler von dieser Größe ist bei der colorimetrischen Methode eben bemerkbar; so wird z. B. eine Mischung von 5 ccm $^m/_{20}$-Borax und 5 ccm $^m/_5$-Borsäure eine Abweichung in der Basenmenge von 0,07 ccm $^n/_{10}$ zeigen und somit die entsprechende Änderung in p_H ungefähr 0,02 betragen. Da aber der nur einmal umkristallisierte Borax I, wie erwähnt, genau den berechneten Basengehalt aufwies, sind solche Präparate selbstverständlich nicht ohne vorherige Umkristallisierung anzuwenden.

Die Wassermenge kann man durch Glühen mit einer Genauigkeit von mindestens $^1/_{500}$ bestimmen; nur muß die Erwärmung im Anfang mit hinlänglicher Vorsicht vorgenommen werden, und zwar nicht zu schnell, weil dann der Borax sich aufbläht

und aus dem Tiegel mit explosionsartiger Heftigkeit geschleudert wird. Zuletzt muß der geschmolzene Borax einige Zeit geglüht werden, um den letzten Rest des Wassers auszutreiben; denn, obgleich Borax nach T. H. Norton und D. M. Roth[1]) 16mal flüchtiger als Natriumchlorid ist, wird die Verdampfung durch ein kurzes Glühen in einem Platintiegel das Analysenresultat doch nicht erheblich ändern[2]).

Durch Glühen von ca. 2 g Borax wich das Gewicht des Glührückstandes bei sämtlichen fünf untersuchten Proben höchstens um $^1/_{500}$ von dem berechneten ab.

Die Bestimmung der Borsäuremenge. Die Borsäure läßt sich in wäßriger Lösung mit Phenolphthalein als Indicator bekanntlich nicht titrieren, weil die Borsäure so schwach dissoziiert ist, daß eine Lösung des Natriumsalzes stark alkalisch reagiert; z. B. wird die Wasserstoffionenkonzentration in einer $^m/_{10}$-Lösung von NaH_2BO_3 nur 10^{-11} betragen, und somit der Wasserstoffionenkonzentration einer $^n/_{1000}$-Natriumhydroxydlösung ungefähr entsprechen. In Übereinstimmung hiermit zeigte eine Titrierung, daß eine $^m/_5$-Borsäurelösung mit Phenolphthalein schon durch Zusatz von nur $^1/_{20}$ bis $^1/_{10}$ Äquivalent Natriumhydroxyd für jedes Äquivalent Borsäure rot gefärbt wurde (selbst wenn die Borsäure als einbasisch gerechnet wurde). Auch mittels eines Indicators, dessen Farbenumschlag bei der Wasserstoffionenkonzentration 10^{-11} liegt, läßt sich die Titrierung nicht genau ausführen, denn bei 10^{-11} ändert sich die Wasserstoffionenkonzentration einer Lösung zu wenig durch Zusatz von Säure bzw. Base.

Dagegen hat man durch Zusatz von Glycerin gute Ergebnisse erreicht. Ob dies auf eine derartige Änderung der Dissoziation, daß das Natriumhydroxyd und die Borsäure (als einbasisch gerechnet) beide gleich stark dissoziiert werden, beruht, oder ob es ausschließlich von einer Bildung von Glycerinverbindungen herrührt, scheint noch nicht mit Sicherheit entschieden zu sein, ist übrigens auch für die Analyse ganz belanglos.

Um die Borsäuremenge zu titrieren, wurden ca. 0,5 g Borax mit 15 ccm Wasser und ein wenig mehr als der der Base entsprechenden Menge Schwefelsäure (2 ccm 2n.) erwärmt, bis alles

---

[1]) Journal of the Amer. Chem. Soc. **19**, 156, 1897.

[2]) Sigmund Waldbott, ibid. **16**, 414, 1894.

in Lösung gegangen war. Nach Abkühlung wurde der Überschuß der Schwefelsäure mit $^n/_5$-Natriumhydroxyd und fünf Tropfen Methylrot (0,1 g in 300 ccm 93%igem Alkohol und 200 ccm Wasser) als Indicator zurücktitriert. Der Umschlag war so deutlich, daß die Titrierung ebenso genau wie die Abmessung der Titerflüssigkeit wurde. Nun wurden 150 ccm Glycerin (spezifisches Gewicht 1,23), reichlich Phenolphthalein (1 ccm einer Lösung von 0,5 g in 50 ccm Alkohol und 50 ccm Wasser) und schließlich $^n/_5$-Natronlauge (ca. 25 ccm) zugesetzt, bis der erste rote Farbenton erscheint; zur Vergleichung diente eine wäßrige Lösung von Glycerin. Der Umschlag war mit 0,02 ccm $^n/_5$ Natriumhydroxyd wahrnehmbar und mit 0,05 sehr deutlich; die Genauigkeit beträgt somit mindestens $^1/_{500}$, und innerhalb dieser Fehlergrenze erwiesen sich die in den fünf untersuchten Proben gefundenen Borsäuremengen gleich den berechneten.

Zufolge der Beschreibungen der Methode ist die ganze Borsäuremenge erst dann titriert, wenn die vom Phenolphthalein hervorgerufene rote Farbe durch weiteren Zusatz von Glycerin nicht mehr verschwindet, und meistens werden 30 bis 40 ccm zur Titrierung von 0,5 g Borax als hinreichend angegeben. Bei den obengenannten Analysen wurde indessen gefunden, daß eine Menge von 150 ccm erforderlich wäre, und daher wurde es versucht, die Bedeutung der zugesetzten Glycerinmenge durch eine Titrierung zu erläutern, die sich von den obenerwähnten Titrierungen nur dadurch unterscheiden, daß das Glycerin nicht auf einmal, sondern nach und nach portionenweise zugesetzt wurde. Nach jedem Zusatz wurde die verbrauchte Natriumhydroxydmenge abgelesen und zugleich korrigiert für die Menge, die dem entsprechenden Volumen Glycerin hinzuzufügen wäre, um eine eben sichtbare rote Farbe mit Phenolphthalein zu bekommen (die Menge beträgt ungefähr 0,01 ccm zu 25 ccm Glycerin).

0,4970 g reiner Borax entsprechend $5 \cdot 0{,}4970 \cdot 4000 : 382{,}16 = 26{,}01$ ccm $^n/_5$-Natriumhydroxyd wurde abgewogen, und die Titrierung ergab dann folgende Zahlenwerte:

Glycerin . . . ccm	0	25	50	75	100
$^n/_5$-NaOH . . ccm	ca. 2,5	25,48	25,82	25,94	25,97
Abweichung . . .	1 : 1,1	1 : 50	1 : 140	1 : 370	1 : 650

Glycerin . . . ccm	125	150	175	200
$^{n}/_{5}$-NaOH . . ccm	25,99	26,01	26,02	26,02
Abweichung . . .	1:1300	0	1:2600	1:2600

Aus dem obigen erhellt deutlich, daß die Titrierung ohne Glycerin ein ganz irreleitendes Resultat gibt (ganz davon abgesehen, daß der Umschlag hier sehr unscharf ist), daß aber schon durch 25 ccm Glycerin ein ziemlich guter Wert der Borsäuremenge sich ermitteln läßt, indem die Abweichung der gefundenen Natronmenge von der aus dem Gewicht des Borax berechneten nur $^{1}/_{50}$ beträgt. Durch Zusatz von 75 ccm Glycerin beträgt die Abweichung weniger als $^{1}/_{800}$, eine bei Titrierungen gewöhnlich als nicht zu groß anzusehende Abweichung; aus den Zahlen ergibt sich jedoch, daß die Bestimmungen mit noch größerer Genauigkeit ausgeführt werden können, wenn man die Glycerinmenge verdoppelt; und das ist der Grund, warum 150 ccm Glycerin bei den obengenannten Analysen benutzt wurden. Daß diese Titrierung beim Zusatz von 150 ccm Glycerin keine und bei noch größeren Dosen eine negative Abweichung gibt, ist selbstverständlich nur ein Zufall, da der von der Abwägung des Borax und Titrierung des Glycerins ohne Borax eingeführte Fehler leicht mehr als $^{1}/_{2000}$ betragen wird.

Bezüglich der Borsäurebestimmungen ist noch zu erwähnen, daß etwa vorhandene Kohlensäure als Borsäure titriert wird und deswegen durch fünfminutiges Kochen der noch schwefelsauren Lösung ausgetrieben werden muß. Hierbei ist ein Rückflußkühler zu benutzen, um die Verflüchtigung der Borsäure mit den Wasserdämpfen zu vermeiden, und da die Boraxlösung in diesem Falle mit dem Wasser, mit dem man den Rückflußkühler abspült, verdünnt wird, so ist ein wenig mehr als 150 ccm Glycerin erforderlich, um dieselbe Genauigkeit wie oben zu erlangen. Eine in dieser Weise ausgeführte Analyse gab ganz das gleiche Resultat wie eine entsprechende ohne Kochen, woraus sich ergibt, teils daß das Präparat keine Kohlensäure enthält, teils daß diese Erweiterung der Methode keinen Fehler in die Analyse einführt.

Aus allen diesen Analysen geht also hervor, daß die zwei Proben von Kahlbaum so rein waren, daß sie sich ohne weiteres anwenden ließen, und daß Borax I nur einer Umkrystallisierung bedurfte, um brauchbar zu sein; es ist somit

sehr leicht, sich hinreichend reinen Borax zu verschaffen. Um zu prüfen, inwieweit ein vorliegendes Präparat zur Darstellung von Vergleichsflüssigkeiten sich eignet, bedarf man im allgemeinen nicht alle hier erwähnten Bestimmungen auszuführen; in der Regel mag eine Titrierung der Basenmenge genügen.

Die Konzentrationen der Stammlösungen, mit denen die Vergleichsflüssigkeiten durch Mischung in verschiedenen Verhältnissen dargestellt werden, waren nun derart zu wählen, daß ein bestimmter Unterschied der Wasserstoffionenkonzentration — innerhalb des für Meerwasseruntersuchungen wichtigsten Bereiches — dem größten möglichen Unterschied der Mischungsverhältnisse entsprechen würde, wodurch man erreicht, daß die Ungenauigkeit der Abmessung den geringsten möglichen Einfluß auf die Wasserstoffionenkonzentration der Vergleichslösungen ausüben wird.

Die Wasserstoffionenkonzentration wurde demzufolge in einer Reihe Mischungen von $^m/_{40}$-Borax und $^m/_5$-Borsäure sowie von $^m/_{20}$-Borax und $^m/_{10}$-Borsäure und ebenfalls von $^m/_{20}$-Borax und $^m/_5$-Borsäure gemessen, und aus diesen war deutlich zu ersehen, daß es das vorteilhafteste war, das letztgenannte Konzentrationspaar anzuwenden, das deshalb näher untersucht wurde[1]).

Da Borax in Lösung in allen Beziehungen wie eine Mischung der entsprechenden Menge Natriumhydroxyd und Borsäure sich verhält, wird die $^m/_{20}$-Boraxlösung identisch mit der früher benutzten Boratlösung, die aus Natriumhydroxyd und Borsäure derartig hergestellt wurde, daß sie in bezug auf Natriumhydroxyd $^n/_{10}$ und in bezug auf Borsäure $^m/_5$ wurde; die Boraxlösung ist nur beträchtlich bequemer darzustellen.

Wie leicht zu ersehen ist, wird in Mischungen von verschiedenen Mengen $^m/_{20}$-Borax und $^m/_5$-Borsäure die Konzentration der letzteren in allen $^m/_5$ werden, wogegen die Konzentration des Natriumhydroxyds — und demzufolge der Wasserstoffionen — variieren wird. Daraus folgt, daß der Salzfehler abhängig von der Wasserstoffionenkonzentration wird, was bei

---

[1]) Überdies wurde sowohl mit $^m/_{20}$- als mit $^m/_{40}$-Borax gemischtes $^m/_{15}$-Phosphat gemessen; die Wasserstoffionenkonzentration und der Salzfehler dieser Mischungen ändert sich jedoch so unregelmäßig mit dem Mischungsverhältnis, daß sie nicht anzuwenden waren.

den ursprünglichen Lösungen nicht der Fall war. Man wird sich erinnern, daß der Salzfehler auf der Änderung der Farbennuancen beruht, welche die Salze unabhängig von ihrem Einfluß auf die Wasserstoffionenkonzentration verursachen, und daß die Größe durch den Unterschied zwischen dem durch die elektrometrische und andererseits dem durch die colorimetrische Methode gefundenen Wasserstoffionenexponenten angegeben wird.

Als Beispiel der verschiedenen Größe des Salzfehlers der Borax-Borsäuremischungen möge angeführt sein, daß er für eine Mischung von 1 ccm $^m/_{20}$-Borax und 9 ccm Borsäure 0,10 größer als für $^m/_{20}$-Borax gefunden wurde. Um der dadurch bei der Anwendurg der Vergleichslösung bewirkten Schwierigkeit abzuhelfen, wurde etwas Natriumchlorid der Borsäurelösung zugesetzt; ein Zusatz von $^1/_{10}$ Mol Natriumchlorid zum Liter, mit dem zuerst gearbeitet wurde, weil die Natriummenge dann dieselbe in allen Mischungen werden würde, war indessen zu viel, indem der Salzfehler dadurch 0,10 niedriger für die genannte Mischung als für $^m/_{20}$-Borax wurde; dagegegen gab $^1/_{20}$ Mol Natriumchlorid einen Salzfehler, der innerhalb der Fehlergrenze der Methode der gleiche für alle Mischungen war.

Durch die elektrometrische Methode wurden nun die Wasserstoffionenkonzentrationen bei 18,0° in einer Reihe Mischungen von $^m/_5$-Borsäure, die auch $^m/_{20}$-Natriumchlorid enthielten, und $^m/_{20}$-Borax gemessen. In der umstehenden Tabelle sind die gefundenen Wasserstoffionenexponenten — $p_{H^\cdot}$ — sowie die entsprechenden Wasserstoffionenkonzentrationen zusammengestellt. Die Hydroxylionenexponenten werden bekanntlich mühelos hieraus durch Subtraktion des $p_{H^\cdot}$ von 14,14 und die Hydroxylionenkonzentration als Antilogarithmus zu diesem Exponenten mit negativem Vorzeichen berechnet. Die Werte des $p_{H^\cdot}$ sind teils als Durchschnittszahlen der Werte mehrerer Messungen ausgerechnet, teils graphisch ausgeglichen, eine Ausgleichung, die aber niemals mehr als eins in zweiter Dezimalstelle betragen hat.

Da eine für die Abhängigkeit des Wasserstoffionenexponenten von dem Mischungsverhältnis gezeichnete Kurve größtenteils nur eine sehr schwache Krümmung aufweist, lassen sich die dazwischenliegenden Werte durch einfache Interpolation berechnen; nur für Mischungen sauerer als 2,5 ccm $^m/_{20}$-Borax

und 7,5 ccm $^m/_5$-Borsäure ist es notwendig, die Kurve auf Millimeterpapier zu zeichnen und graphisch zu interpolieren.

Die Wasserstoffionenkonzentration der Borax-Borsäuremischungen.

$^m/_{20}$-Borax ccm	$^m/_5$-Borsäure ccm	p_H	$C_H \times 10^9$
10,0	0,0	9,24	0,58
9,0	1,0	9,11	0,78
8,0	2,0	8,98	1,05
7,0	3,0	8,84	1,45
6,0	4,0	8,69	2,04
5,5	4,5	8,60	2,51
5,0	5,0	8,51	3,09
4,5	5,5	8,41	3,89
4,0	6,0	8,31	4,90
3,5	6,5	8,20	6,31
3,0	7,0	8,08	8,32
2,5	7,5	7,94	11,5
2,3	7,7	7,88	13,2
2,0	8,0	7,78	16,6
1,5	8,5	7,60	25,1
1,0	9,0	7,36	43,7
0,6	9,4	7,09	64,6
0,3	9,7	6,77	170,0

Bei hydrographischen Untersuchungen, wozu diese Mischungen besonders bestimmt sind, braucht man am häufigsten die Mischungen, die 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,0, 2,3, 1,5 ccm $^m/_{20}$-Borax enthalten und bedarf nur bei besonders schwach alkalischem (schwefelwasserstoffhaltigem) Wasser zugleich die 2,5, 2,0, 1,5, 1,0, 0,6, 0,3 ccm Borax enthaltenden Mischungen.

Der Salzfehler für diese neuen Boratmischungen ist durch direkte Messungen des Meerwassers nicht bestimmt; da solche Messungen nämlich für die ursprünglichen Boratlösungen mit großer Sorgfalt ausgeführt sind, ist eine colorimetrische Messung der neuen mittels der alten völlig hinreichend; findet man dann hierdurch den gleichen Wasserstoffionenexponenten wie durch die elektrometrische Methode, so ist der Salzfehler der gleiche für beiderlei Boratmischungen. Dieses wurde ebensowohl für Phenolphthalein als für Naphtholphthalein gefunden, sowie auch für Neutralrot (bei dem letzten Indikator wurden Phosphatmischungen als Vergleichslösungen benutzt).

Die Größe des Salzfehlers ist daher gleich der schon früher

von S. P. L. Sörensen und S. Palitzsch[1]) für Meerwasserproben mit irgendeinem Salzgehalt bestimmten.

Aus den diesbezüglichen Kurven[2]) ergibt sich, daß der Salzfehler z. B. für

	35‰ Salz	20‰ Salz	10‰ Salz
Phenolphthalein	÷ 0,21	÷ 0,16	÷ 0,09
Naphtholphthalein	÷ 0,22	÷ 0,17	÷ 0,09
Neutralrot	+ 0,10	+ 0,05	0,00

beträgt.

(Phenolphthalein ist bei den Mischungen mit 10 bis 3,5 ccm, Naphtholphthalein bei solchen mit 4,5 bis 0,6 ccm und Neutralrot mit 2,0 bis 0,3 ccm $^m/_{20}$-Borax zu benutzen.)

Die Stammlösungen werden in gewöhnlicher Weise und mit gehöriger Berücksichtigung der Kohlensäure der Luft hergestellt und aufbewahrt, die Boraxlösung durch Lösung von 19,108 g Borax und die Borsäurelösung durch Lösung von 12,404 g Borsäure und 2,925 g Natriumchlorid in ausgekochtem Wasser und Verdünnung auf ein Liter. Für lange dauernde Expeditionen sind die betreffenden Mengen der festen Stoffe vor der Abreise in Glasflaschen mit eingeschliffenen Stöpseln abzuwägen und die Stöpsel mit Pergamentpapier zu überbinden.

Da an Bord der Meeruntersuchungsschiffe ausgekochtes Wasser zu verschaffen manchmal sehr schwierig sein kann, ist auch die Notwendigkeit, das Wasser auszukochen, untersucht worden. Durch das zur Lösung zu benutzende Wasser wurde atmosphärische Luft ca. 4 Stunden geleitet; bei colorimetrischer Vergleichung der hiervon dargestellten Flüssigkeiten mit ähnlichen mittels ausgekochten Wassers hergestellten Proben war gar kein Unterschied bemerkbar; sowohl Phenolphthalein wie Naphtholphthalein wurde als Indicator angewendet. In diesem Falle scheint somit eine geringe Menge Kohlensäure unschädlich zu sein. (Dagegen darf selbstverständlich die alkalische Boraxlösung dem Einfluß der atmosphärischen Luft nicht ausgesetzt werden.)

Freilich sind diese neuen Boratmischungen zunächst für hydrographische Messungen berechnet, da dieselben aber besonders leicht und bequem durch Lösung einer abgewogenen Menge Stoff in Wasser und Verdünnung auf ein bestimmtes Volumen hergestellt werden können, lassen sie sich mit Vorteil überall anwenden, wo man Lösungen, deren Wasserstoffionenexponent zwischen 7 und 9 liegt, bedarf. Ferner werden die

[1]) Diese Zeitschr. 51, 307, 1913.

[2]) Die Kurven der Tafeln I und III (diese Zeitschr. 51, 310, 1913) sind leider vertauscht.

Mischungen von $^{m}/_{20}$-Borax und $^{n}/_{10}$-Natriumhydroxyd völlig identisch sein mit den von S. P. L. Sörensen[1]) beschriebenen Mischungen von Borat und Natriumhydroxyd.

Als Kontrolllösungen bei der Formoltitrierung werden z. B. die Boraxmischungen wohlgeeignet sein, indem es hierzu selbstverständlich ganz überflüssig ist, zuerst die zwei Stammlösungen herzustellen und danach zu mischen; die berechneten Mengen von Borax, Borsäure und Natriumchlorid in der der gewünschten Wasserstoffionenkonzentration entsprechenden Mischung werden alle auf einmal in ausgekochtem Wasser gelöst.

In derselben bequemen Weise ist die bei der von P. A. Kober und K. Sugiura[2]) ausgearbeiteten mikrochemischen Bestimmung der Aminosäuren zu benutzende Boraxmischung zu bereiten. Eine mit der von Kober und Sugiura vorgeschlagene identische Lösung erhält man durch Lösung von $0{,}25 \times 12{,}404 = 3{,}101$ g Borsäure, $0{,}25 \times 5{,}846 = 1{,}462$ g Natriumchlorid und $(0{,}75 - 0{,}25) \times 19{,}108 = 9{,}554$ g Borax in Wasser und Verdünnung auf ein Liter. Diese Lösung entspricht 7,5 ccm Borat und 2,5 ccm $^{n}/_{10}$-Salzsäure, worin die Konzentration des Borates etwas niedriger wird, als wenn man die Menge aus der Tabelle der Borax-Borsäuremischungen berechnet; für diese letzteren entsprechen 6,7 ccm $^{m}/_{20}$-Borax und 3,3 ccm $^{m}/_{5}$-Borsäure einem p_H gleich 8,8, und die Lösung muß demzufolge in einem Liter $0{,}33 \times 12{,}404 = 4{,}093$ g Borsäure, $0{,}33 \times 2{,}925 = 0{,}965$ g Natriumchlorid und $0{,}67 \times 19{,}108 = 12{,}802$ g Borax enthalten.

Schließlich ist noch zu erwähnen, daß C. L. A. Schmidt und C. P. Finger[3]) schon 1908 in einer Abhandlung, auf die ich erst nach dem Abschluß der vorliegenden Arbeit aufmerksam wurde, die Anwendung von Borax und Borsäure als Vergleichsflüssigkeiten vorgeschlagen haben, doch ohne die Anwendbarkeit dieser Stoffe bei der colorimetrischen Messung zu untersuchen.

Professor Dr. phil. S. P. L. Sörensen möchte ich auch an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank für seinen Rat und freundliche Hilfe aussprechen.

---

[1]) Diese Zeitschr. **21**, 177, 1909.

[2]) Journ. of the Amer. Chem. Soc. **35**, 1558, 1913.

[3]) Journ. of Physic. Chem. **12**, 406, 1908.

Zur Kenntnis der Eiweißkörper.

I. Läßt sich durch Pepsin, Trypsin und Erepsin eine vollständige Hydrolyse der Eiweißkörper erreichen?

Von

A. C. Andersen.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Kgl. tierärztlichen und landwirtschaftlichen Hochschule, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 19. Mai 1915.)

Wie allgemein bekannt, läßt sich durch Kochen der Eiweißkörper mit starken Säuren oder Basen eine vollständige Hydrolyse derselben bis zu Aminosäuren bewerkstelligen, die jedoch von sekundären Spaltungen begleitet ist, durch die einige Aminosäuren, wie z. B. das Tryptophan, zerstört werden. Ferner wissen wir, daß die Eiweißkörper in der Nahrung der Tiere durch das Aminosäuregemisch, das bei Hydrolyse der Eiweißkörper entsteht, ersetzt werden können, wenn nur keine Aminosäure fehlt, die für den Organismus unentbehrlich ist. Eine solche Aminosäure ist aber eben das Tryptophan, und mittels des Aminosäuregemisches, das durch Zerlegen der Eiweißkörper mit starken Säuren oder Basen erhalten wird, läßt sich daher, wie bekannt, kein Stickstoffgleichgewicht erzielen. Eine Methode zur Hydrolyse der Eiweißkörper, die kaum von sekundären Spaltungen begleitet ist, haben wir in der Behandlung mit den gewöhnlichen Verdauungsenzymen, und bei den vielen Untersuchungen, die in unserer Zeit zur Lösung der Frage vom Schicksal der Eiweißkörper im Organismus der Tiere ausgeführt werden, benutzt man daher sehr oft durch Enzyme abgebaute Eiweißkörper als stickstoffhaltige Nahrung. Es ist somit von nicht geringer Bedeutung, zu wissen, ob, und zwar unter welchen Bedingungen die Eiweißkörper durch die Einwirkung der Enzyme vollständig zu Aminosäuren hydrolysiert werden können.

Es wird oft angegeben, daß eine vollständige Hydrolyse leicht erreichbar ist. Dies scheint aber nicht zuzutreffen; jedenfalls war es Henriques und mir[1]) unmöglich, zu vollständig

[1]) V. Henriques und A. C. Andersen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 361, 1913.

hydrolysierten Produkten zu kommen. Auch das Erepton, das unter der Bezeichnung: „Vollständig abgebautes Fleisch nach Prof. Dr. Abderhalden“ von der Fabrik vorm. Meister Lucius und Brüning, Höchst a. M., in den Handel gebracht wird, zeigte sich bei der Analyse als unvollständig abgebaut. Im folgenden soll näher über einige Versuche berichtet werden, die zur Aufklärung der hier erwähnten Frage angestellt worden sind.

Schon seit langem wissen wir, daß die Verdauung mit Pepsin und Trypsin keine vollständige Hydrolyse bewirkt. Es ist nun die Frage, ob bei Hinzufügung von Erepsin die Spaltung restlos bis zu Aminosäuren geht.

O. Cohnheim, der Entdecker des Erepsins, war der erste, der nachzuweisen versuchte, daß sich mittels des Erepsins eine vollständige Hydrolyse erzielen lasse. Damals gab es aber keine Methode zum sicheren Nachweis der vollständigen Hydrolyse, und seine Resultate sind daher wenig beweiskräftig.

Bei den ersten Untersuchungen[1]) ging er von der Annahme aus, daß die bei unvollständiger Verdauung noch vorhandenen Peptide durch Phosphorwolframsäure fällbar seien, und daß sie Monoaminosäuren enthielten. Er fällte daher das Verdauungsgemisch mit Phosphorwolframsäure. Der Niederschlag wurde mit Baryt zerlegt und dann mit Schwefelsäure von 33$^0/_0$ gekocht, wodurch eventuell noch vorhandene Peptidbindungen gelöst werden. Durch Fällen mit Phosphorwolframsäure wurden nun die Diaminosäuren beseitigt und im Filtrate, das die vorhandenen Monoaminosäuren enthalten sollte, der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt; die vorhandene Stickstoffmenge war aber so klein, daß er den Schluß für berechtigt hielt, daß die Spaltung des Eiweißes durch kombinierte Pepsin-Erepsinwirkung sicherlich fast, wahrscheinlich aber ganz vollständig sei.

Diese Versuche sind jedoch nur wenig beweiskräftig, denn erstens können im Filtrate der ersten Phosphorwolframsäurefällung Peptide vorhanden sein, und zweitens können im Phosphorwolframsäureniederschlag Peptide der Diaminosäuren vorliegen. Wir wissen zu wenig über die Verdauungsprodukte, um uns über diese Möglichkeiten bestimmt äußern zu können.

In einer neuen Versuchsreihe unterwarf Cohnheim daher die Frage einer neuen Untersuchung mit einer anderen Metho-

[1]) O. Cohnheim, Zeitschr. f. physiol. Chem. 49, 64, 1906.

dik[1]). Er ging von der Annahme aus, daß alle Peptide gespalten sind, wenn die gesamte Argininmenge in Freiheit gesetzt ist, und verfuhr folgendermaßen. Ein Hund mit Duodenalfistel wurde mit Fleisch gefüttert, und das aus der Fistel kommende Verdauungsgemisch nach dem Filtrieren in zwei Portionen geteilt. Die eine Portion wurde mit Schwefelsäure vollständig hydrolysiert, die andere nach dem Neutralisieren mit Erepsin verdaut. Beide Lösungen wurden dann mit Phosphorwolframsäure gefällt, und in den beiden Niederschlägen wurde die Argininmenge nach der Kosselschen Methode bestimmt. Es resultierte in beiden Fällen fast dieselbe Argininmenge, d. h. es wird durch die aufeinanderfolgende Wirkung der Verdauungsenzyme aus den Eiweißkörpern des Fleisches ebensoviel Arginin abgespalten wie durch die Säurespaltung, und Cohnheim meinte, hieraus schließen zu dürfen, daß die Hinzufügung des Erepsins zu den anderen Enzymen die Vollständigkeit der Verdauung bewirkt. Es muß aber betont werden, daß diese Schlußfolgerung nur dann berechtigt ist, wenn die Annahme von der Vollständigkeit der Hydrolyse bei erfolgtem Freimachen der gesamten Argininmenge richtig ist, und darüber wissen wir nichts.

Ein anderes Verfahren zur Lösung derselben Frage ist von Abderhalden und seinen Mitarbeitern benutzt worden[2]). Für die Fütterungsversuche mit tief abgebauten Eiweißkörpern überließen sie Fleisch in Gegenwart von Toluol der Autolyse 14 Tage bei 37°, dann wurde Pankreassaft zugesetzt und 4 Wochen später noch Darmsaft; nach 3 Monaten wurde die Verdauung unterbrochen. Zur Untersuchung der Verdauungsprodukte verwandten sie dann die bekannte Fischersche Estermethode, indem sie einen Vergleich anstellten zwischen der aus den verschiedenen Esterfraktionen erhältlichen Menge der Aminosäurechlorhydrate bei den Verdauungsprodukten und bei Fleisch, das mit Salzsäure hydrolysiert worden war. Es ergab sich eine solche Übereinstimmung, daß sie es für berechtigt hielten, das Fleisch als praktisch vollständig abgebaut zu betrachten.

Auch diese Methode gestattet keine sicheren Schlüsse.

---

[1]) O. Cohnheim, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51, 415, 1907.

[2]) E. Abderhalden und P. Rona, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 508, 1907; E. Abderhalden und E. S. London, ibid. 54, 80, 1907; siehe auch E. Abderhalden und P. Rona, ibid. 67, 405, 1910.

Erstens muß man befürchten, daß durch die Einwirkung der Salzsäure während der Veresterung Peptidbindungen gelöst werden[1]); zwar meinen Abderhalden und Hanslian[2]), daß diese Möglichkeit nicht in Betracht kommt, wenn man nur dafür Sorge trägt, alles Wasser durch wiederholtes Eindampfen im Vakuum mit absolutem Alkohol zu entfernen, und sie führen einige Versuche mit synthetischen Polypeptiden — 2 Dipeptiden, 2 Tripeptiden und 1 Tetrapeptid — als Beweis an. Sie veresterten die Peptide je für sich, indem sie vor und nach der Veresterung die Menge des Aminostickstoffs mittels der Van Slykeschen Methode bestimmten und keine Zunahme konstatieren konnten, jedenfalls nicht, wenn sie die Veresterung in der Kälte ausführten. Es muß hier bemerkt werden, daß keine freien Aminosäuren neben den Polypeptiden vorhanden waren, d. h. es bildete sich bei der Veresterung nur sehr wenig Wasser. Finden sich aber solche in überwiegender Menge in der alkoholischen Lösung, so wird bei der Veresterung derselben viel mehr Wasser gebildet als zur Hydrolyse der in verhältnismäßig geringerer Menge vorhandenen Peptide notwendig ist, und wir müssen somit eine Hydrolyse befürchten. Auch ist es möglich, daß in einem Verdauungsgemisch Peptide vorhanden sind, die empfindlicher gegen rauchende alkoholische Salzsäure sind als die 5 untersuchten. Ferner sind nur die Verhältnisse bei der Veresterung untersucht worden; was bei dem Freimachen der Ester und bei der Destillation derselben mit vorhandenen Peptidestern geschieht, wissen wir nicht.

Zweitens arbeitet die Estermethode mit so großen Verlusten[3]), daß allein die hierdurch bedingte Unsicherheit genügt, um die Methode bei derartigen Untersuchungen wie den hier in Frage stehenden als ungeeignet zu verwerfen. Es kann mit dieser Methode, wenigstens wie sie jetzt vorliegt, nicht sichergestellt werden, inwiefern neben Aminosäuren kleine Peptidmengen vorhanden sind.

Nachdem Sörensen die jetzt so viel benutzte Formol-

---

[1]) Siehe auch B. O. Pribram, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 472, 1911; 72, 504, 1911.

[2]) E. Abderhalden und R. Hanslian, ibid. 77, 285, 1912.

[3]) E. Abderhalden und A. Weil, ibid. 74, 445, 1911; 77, 59, 1911.

titrierung ausgearbeitet hatte[1]), war es möglich geworden, der Frage, ob vorliegende Eiweißpräparate vollständig abgebaut seien oder nicht, in exakter Weise näher zu treten, indem hier die Menge der vorhandenen Aminogruppen titrimetrisch bestimmt und mit der Menge derselben nach vollständiger Hydrolyse mittels Säure verglichen wird. Das erste Verfahren, das zu diesem Zweck von Sörensen ausgearbeitet wurde, ist in einer Abhandlung von Henriques[2]) veröffentlicht, der das Verfahren zur Analyse einiger Eiweißpräparate benutzte, die zu Fütterungsversuchen verwendet wurden. Nach diesem Verfahren wurde die zu untersuchende Substanz in Wasser gelöst und die Lösung in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde zur Bestimmung der Menge der vorhandenen Aminogruppen benutzt, während die andere Hälfte mit ebensoviel konzentrierter Salzsäure versetzt und auf dem Wasserbade möglichst verdampft wurde; der verbleibende Rest wurde abgekühlt, in ebensoviel konzentrierter Salzsäure wie vorher gelöst und wieder eingedampft und wurde dann als vollständig hydrolysiert betrachtet. Nach Lösung in Wasser wurde die Menge der jetzt vorhandenen Aminogruppen bestimmt; die Differenz ergab die Menge des in dem zu analysierenden Präparat vorhandenen „peptidgebundenen Stickstoffs". Henriques benutzte das Verfahren zur Kontrolle der Wirkung der Verdauungsenzyme auf verschiedene Eiweißkörper und fand, daß sowohl die Trypsin- wie auch die Erepsinverdauung in vitro sehr langsam von statten geht und bei weitem nicht, wie von Cohnheim angenommen, in 24 Stunden beendigt wird, sondern mehrere Monate dauert. Trotz vieler Versuche gelang es nur zweimal, zu Produkten zu gelangen, die sich als vollständig abgebaut zeigten.

Später haben Henriques und Gjaldbäk das Verfahren einer Nachprüfung unterworfen[3]), wodurch es sich zeigte, daß das zweimalige Eindampfen mit Salzsäure nicht genügt, um eine vollständige Hydrolyse herbeizuführen. Sind die zu analysierenden Produkte sehr stark abgebaut, so bleibt nach dem zweimaligen Eindampfen mit Salzsäure nur wenig peptid-

[1]) S. P. L. Sörensen, Biochem. Zeitschr. 7, 45, 1907; S. P. L. Sörensen und H. Jessen-Hansen, ibid. 7, 407, 1907.

[2]) V. Henriques, Zeitschr. f. physiol. Chem. 54, 408, 1908.

[3]) V. Henriques und J. K. Gjaldbäk, Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 8, 1910.

gebundener Stickstoff zurück; eine vollständige Hydrolyse ist erreichbar durch mehrstündiges Kochen mit starker Salzsäure unter Verwendung eines Rückflußkühlers oder durch Autoklavieren mit 3n. Salzsäure während $1^1/_2$ Stunden bei 150°, was sich in allen untersuchten Fällen, sowohl für genuine Eiweißkörper wie auch für Spaltprodukte, als hinreichend erwiesen hat.

Henriques und Gjaldbäk gelangten bei der Verdauung von Fleisch mit Trypsin-Erepsin immer zu Präparaten, die noch 6 bis 12% peptidgebundenen Stickstoff enthielten. Auch Henriques und mir (l. c.) war es unmöglich, zu vollständig abgebauten Produkten zu gelangen, weshalb wir bei den von uns angestellten Versuchen über parenterale Ernährung durch intravenöse Injektion Präparate mit 10 bis 15% peptidgebundenen Stickstoffs benutzen mußten.

Diesen Erfahrungen gegenüber stehen die Angaben von Abderhalden und Rona[1]), die mit der von Henriques und Gjaldbäk (l. c.) mitgeteilten Arbeitsmethode eine Reihe von 11 Präparaten, alle durch Verdauung von Fleisch hergestellt, untersucht und vollständig abgebaut gefunden haben. Später hat Abderhalden[2]) 10 Präparate, die durch Verdauung von verschiedenen Eiweißkörpern (Fleisch, Casein, Gelatine) erhalten waren, mit der Van Slykeschen Methode zur Bestimmung der Aminogruppen[3]) untersucht und die meisten von diesen praktisch genommen vollständig abgebaut gefunden.

Es besteht somit ein Widerspruch zwischen den Erfahrungen in den hiesigen Laboratorien und denen, die in Abderhaldens Laboratorium über die Möglichkeit einer vollständigen Verdauung der Eiweißkörper in vitro mittels der gewöhnlichen Verdauungsenzyme gewonnen sind. Weil es für viele Untersuchungen von großer Bedeutung sein kann, über möglichst vollständig abgebaute Eiweißkörper zu verfügen, habe ich die Frage einer näheren Untersuchung unterworfen, über die im folgenden berichtet werden soll.

Die Präparate, die von Henriques und mir (l. c.) zu den

---

[1]) E. Abderhalden und P. Rona, Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 409, 1910.

[2]) E. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 77, 56, 1911.

[3]) D. D. Van Slyke, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 5, 995 und 6, 278; Journ. of biol. Chem. 9, 185, 1911 und 12, 275, 1912.

Untersuchungen über parenterale Ernährung durch intravenöse Injektion benutzt wurden, waren in folgender Weise hergestellt. 3 kg durch Passieren durch eine Fleischhackmaschine fein zerkleinertes Fleisch wurde mit Toluol gut durchgeknetet, in einer Flasche mit 7 l Leitungswasser gut durchgeschüttelt und im Thermostaten bei 37° bis zum nächsten Tag aufbewahrt. Dann wurde die sauer reagierende Mischung mit Natriumhydroxyd oder Natriumkarbonat versetzt, bis sie auf Lackmuspapier neutral oder ganz schwach alkalisch reagierte; es wurde stets dafür gesorgt, daß die Mischung niemals alkalisch gegen Curcumapapier reagierte[1]). Die so erhaltene Mischung wurde mit 1 oder 2 g Pankreatin „Rhenania" versetzt und mehrere Tage bei 37° aufbewahrt, dann wurde aufs neue 1 oder 2 g Pankreatin zugesetzt usw., indem es besser scheint, öfters kleine Mengen Pankreatin als größere Mengen auf einmal zuzusetzen. Nach wochenlangem Stehen wurde Darmpreßsaft neben dem Pankreatin zugesetzt, indem auch hier mit Zwischenräumen von mehreren Tagen kleinere Mengen zugesetzt wurden, gewöhnlich je 25 ccm. Nach monatelangem Stehen in dieser Weise enthielten die Produkte noch 10 bis 15 $^0/_0$ peptidgebundenen Stickstoff, d. h. 10 bis 15 $^0/_0$ des Gesamtstickstoffs in solcher Bindung, daß der Stickstoff erst nach Säurebehandlung formoltitrierbar wurde. Die Lösungen wurden dann aufgekocht, durch Leinwand filtriert und zur Injektion benutzt.

Wie hieraus ersichtlich, wurde die Pepsinverdauung weggelassen. Dies geschah teils, weil die Vorverdauung mit Pepsin wahrscheinlich nicht notwendig ist, und teils weil zur Beschaffung der für die Pepsinwirkung notwendigen Wasserstoffionenkonzentration recht große Mengen von Salzsäure erforderlich sind, bei deren Neutralisation so viel Salz entsteht, daß es lästig wird.

Das hier erwähnte Verfahren führte nie zu vollständig abgebauten Produkten, und auch durch die im folgenden beschriebenen Versuche ist es nicht gelungen, einen vollständigen Abbau zu erzielen.

Über die Methode, nach der im Abderhaldenschen Laboratorium die in der Literatur als vollständig abgebaut erwähnten

[1]) Sowohl Trypsin wie auch Erepsin wirken am besten bei P_H = ca. 7,7 (L. Michaelis und H. Davidsohn, Biochem. Zeitschr. **36**, 284, 1911; P. Rona und F. Arnheim, ibid. **57**, 84, 1913).

Präparate hergestellt worden sind, liegen leider keine genaueren Angaben vor. Die erste Angabe, die mir bekannt ist, ist die folgende[1]): Fleisch wird 14 Tage unter Toluol bei 37° der Autolyse überlassen. Zu der Verdauungsflüssigkeit wird dann Pankreassaft und schließlich nach 4 Wochen noch Darmsaft gesetzt. Die ganze Verdauung dauert 3 Monate. Später heißt es[2]): „Im Gegensatz zu Henriques und Gjaldbäk hat sich gezeigt, daß es leicht gelingt, durch kombinierte Verdauung von Proteinen und speziell von Fleisch mit Pepsinsalzsäure, Trypsin und Erepsin eine vollständige Hydrolyse herbeizuführen. Nach neueren Erfahrungen genügt schon eine Verdauung von 3 bis 4 Wochen." Ferner wird über das von den Höchster Farbwerken nach den Angaben Abderhaldens dargestellte Erepton mitgeteilt[3]): „Dieses Präparat ist durch sukzessive Einwirkung von Magensaft, Pankreas- und Darmpreßsaft auf ganz mageres Rindfleisch gewonnen worden". Spätere Angaben über das Verfahren sind mir nicht bekannt, jedoch scheint es abgeändert worden zu sein, und zwar nach der Richtung hin, daß die Magensaftverdauung weggefallen ist, denn die 3 Ereptonpräparate, die ich im Laufe eines Jahres von den Höchster Farbwerken erhalten habe, sind, wenn auch nicht völlig chlorfrei, so doch so arm an Chlor, daß die Herstellung mittels Pepsinsalzsäure sehr zweifelhaft erscheint. Als Beispiel kann angeführt werden, daß die Chlormenge des Ereptons III (siehe Tabelle I) nur etwa 1,5 ccm $^n/_{10}$-Silbernitratlösung pro Gramm Erepton entspricht; vergleiche hierzu die Salzsäuremenge, die bei dem unten erwähnten Verdauungsversuch zur Beschaffung der nötigen Wasserstoffionenkonzentration notwendig war.

Bei der Analyse der Präparate war das Verfahren das folgende:

Falls feste Präparate vorlagen (z. B. Erepton), wurde so viel davon in 100 ccm Wasser gelöst, wie ungefähr 0,4 g Stickstoff entsprach; Lösungen, nach den oben mitgeteilten Angaben hergestellt, wurden entsprechend verdünnt. In 5 ccm finden sich dann 20 bis 25 mg Stickstoff.

---

[1]) E. Abderhalden und P. Rona, Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 508, 1907.

[2]) E. Abderhalden und P. Rona, ibid. 67, 411, 1910.

[3]) E. Abderhalden und A. Suwa, Zeitschr. f. physiol. Chem. 68, 416, 1910.

In 5 ccm wurde der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

20 ccm dienten zur Bestimmung des vorhandenen Ammoniaks in der von Henriques und Sörensen angegebenen Weise[1]).

20 ccm wurden genau neutralisiert (Henriques und Sörensen S. 133) und nach Zugabe von Formol mit $^{n}/_{5}$-Natronlauge und Phenolphthalein als Indicator bis zu stark roter Farbe der Kontrollösung titriert (S. P. L. Sörensen, l. c. S. 64). Falls die Lösung zu dunkel ist, um eine genaue Titrierung zu gestatten, wird sie erst mit Silbernitrat geklärt (Sörensen und Jessen-Hansen, l. c.).

50 ccm wurden mit 16 bis 17 ccm konz. Salzsäure (die Mischung ist dann ungefähr 3 n.) versetzt und $1^{1}/_{2}$ Stunden im Autoklave bei 150° erhitzt, wonach die Lösung auf dem Wasserbade möglichst eingedampft wurde. Der Rest, in ein wenig Wasser gelöst, wurde in einen 50 ccm-Meßkolben gebracht, und es wurde mit kleinen Mengen Wasser nachgespült, bis im Kolben 20 bis 25 ccm Lösung vorhanden waren. Nun wurden 4 ccm etwa 2 n. Bariumchloridlösung zugefügt und dann in kleinen Mengen und unter gutem Umschütteln 20 ccm etwa $^{n}/_{8}$-Silbernitratlösung (Sörensen und Jessen-Hansen l. c.). Schließlich wurde mit Wasser bis auf 50 ccm aufgefüllt und durch einen trockenen Filter filtriert. Von dem Filtrat dienten 20 ccm zur Bestimmung des Ammoniaks und 20 ccm zur Formoltitrierung in der oben angegebenen Weise.

Die Differenz der beiden Formoltitrierungen entspricht der Menge von Ammoniak und Aminogruppen, die bei der Säurebehandlung frei wurden. Wird die Differenz der beiden Ammoniakbestimmungen in Abzug gebracht, so ergibt sich die Menge der freigewordenen Aminogruppen.

Über die Angabe der Resultate sei bemerkt, daß Henriques, während er in seiner ersten Mitteilung die Menge des peptidgebundenen Stickstoffs (hier die Vermehrung des formoltitrierbaren Aminostickstoffs) in Prozenten des Gesamtstickstoffs angab, später vorgeschlagen hat, die Menge in Prozenten des nach vollständiger Hydrolyse und nach Entfernung des Ammoniaks

---

[1]) V. Henriques und S. P. L. Sörensen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 137, 1909.

noch vorhandenen formoltitrierbaren Stickstoffs anzugeben[1]). Es scheint jedoch am besten, bei der ersten Methode der Berechnung zu bleiben und die Menge des vorhandenen Aminostickstoffs — und somit auch die Vermehrung des Aminostickstoffs — in Prozenten des genau bestimmbaren Gesamtstickstoffs anzugeben, ebenso wie die Menge des Ammoniakstickstoffs, des Arginin-stickstoffs usw. in Prozenten des Gesamtstickstoffs ausgedrückt wird. Es läßt sich dann auch in einfachster Weise aus den Angaben der Menge des formoltitrierbaren Stickstoffs sowie denen des Ammoniaks die Menge des Aminostickstoffs berechnen usw. Übrigens scheint kein Grund vorzuliegen, dem Ammoniak eine Sonderstellung zu geben und es bei der Berechnung des „peptidgebundenen" Stickstoffs in Abzug zu bringen, denn ein Teil des Ammoniaks ist sicherlich sekundär entstanden und also eigentlich Aminostickstoff, und was primär entstanden ist, war im Eiweißmolekel in irgendeiner Weise — wir wissen nicht bestimmt, wie — gebunden, ebensowohl als die peptidgebundenen Aminogruppen. Man sollte daher bei der Angabe des noch „peptidgebundenen" Stickstoffs nicht mit der Menge des Aminostickstoffs, sondern mit der Menge des Amino- + des Ammoniakstickstoffs rechnen.

Mit dem oben beschriebenen Verfahren sind viele Präparate aus Fleisch (von Kalb, Ziege und Hund) hergestellt worden, und wir gelangten immer zu Präparaten, in denen zwischen 67 und 76 % des Gesamtstickstoffs formoltitriert werden konnten; die Ammoniakmenge betrug nur sehr selten 10 % des Gesamtstickstoffs, war aber gewöhnlich erheblich geringer. Nach dem Autoklavieren war die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffs auf 81 bis 89 %, die Ammoniakmenge gewöhnlich auf etwa 14 % des Gesamtstickstoffs gestiegen. Die Säurebehandlung hat somit eine erhebliche Wirkung ausgeübt.

Von einer vollständigen Angabe der vielen Analysenresultate sei Abstand genommen, sie sind, wie gesagt, einander recht ähnlich. Dagegen sind in der Tabelle I die Analysen der eingekauften drei Ereptonpräparate zusammengestellt. Diese sind Doppelbestimmungen und zeigen somit auch, welche Übereinstimmung bei einiger Übung erhalten werden kann. Um einen Vergleich mit den nach obenstehender Beschreibung hergestellten

[1]) V. Henriques und J. K. Gjaldbäk, Zeitschr. f. physiol. Chem. 67, 11, 1910.

Präparaten zu gestatten, sind die Analysen von vier Präparaten in dieselbe Tabelle eingeführt; es liegen jedoch hier nur Einzelbestimmungen vor.

Tabelle I.

Die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffs und des Ammoniaks in Prozenten des Gesamtstickstoffs vor und nach vollständiger Hydrolyse mit Säure.

Präparate	Vor der Hydrolyse		Nach der Hydrolyse		Vermehrung des Aminostickstoffs bei der Hydrolyse NH_2	Vermehrung des Ammoniakstickst. bei der Hydrolyse NH_3
	Menge des formol-titrierbar. Stickstoffs NH_2+NH_3	Menge des Ammo-niak-stickstoffs NH_3	Menge des formol-titrierbar. Stickstoffs NH_2+NH_3	Menge des Ammo-niak-stickstoffs NH_3		
Fleisch von Kalb	68,8	5,9	88,5	14,9	10,7	9,0
Fleisch von Kalb	71,5	7,9	85,0	12,9	8,5	5,0
Fleisch von Hund	74,3	10,1	86,9	15,4	7,3	5,3
Fleisch von Ziege	73,7	8,0	87,8	14,3	7,8	6,3
Erepton I 12,62 % N. Op. 26	68,7	5,85	84,1	12,01	9,2	6,16
	68,7	5,83	83,7	12,11	8,7	6,28
Erepton II 13,5 % N. Op. 32	76,3	6,35	88,2	10,60	7,6	4,25
	76,0	6,42	88,4	10,45	8,4	4,03
Erepton III 12,6 % N. Op. 38	69,3	8,16	89,7	13,64	14,9	5,48
	68,5	7,96	89,5	13,51	15,4	5,55

Es erhellt hieraus, daß keins von den Präparaten vollständig abgebaut war.

Um nun der Frage näherzutreten, inwiefern unter abgeänderten Bedingungen ein völliger Abbau gelingen würde, wurden weitere Versuche mit Fleisch, Eierklar und Casein angestellt. Es wäre möglich, daß die Verdauung mit Pepsinsalzsäure eine Rolle spielt; es wurde daher immer mit einer Pepsinbehandlung angefangen. Ferner wäre es möglich, daß die Konzentration der Lösung von Bedeutung ist; die Verdauung ist daher in mehr oder weniger verdünnter Lösung vorgenommen. Bei der Pepsinverdauung wurde so viel Salzsäure zugesetzt, daß die Günzburgsche Reaktion stark positiv war; zu einer Probe der Lösung sollte ungefähr $^1/_4$ des Volumens an $^n/_5$-Natronlauge zugesetzt werden, um die Reaktion negativ zu gestalten. Um diese Reaktion zu erhalten, war es notwendig, ab und zu etwas Salzsäure hinzuzufügen; die Eiweißkörper wurden dann glatt gelöst.

1. Versuche mit Fleisch.

800 g durch Passieren durch eine Fleischhackmaschine fein zerkleinertes Kalbfleisch + 600 ccm $^n/_2$-Salzsäure + 1000 ccm

$^n/_{10}$-Salzsäure, worin 2 g Pepsin Armour gelöst waren, wurden am 30. X. 13 bei 37° in den Thermostaten gestellt.

Am 31. X. war die Günzburgsche Reaktion negativ geworden. Es wurden 200 ccm $^n/_2$- und 30 ccm 5n-Salzsäure zugesetzt, um wieder geeignete Reaktion hervorzubringen. 2 g Pepsin, in 20 ccm Wasser gelöst, wurden zugegeben.

Am 1. XI. mußten 10 ccm 5n-Salzsäure zugefügt werden. Außerdem wurden 2 g Pepsin zugesetzt wie früher.

Am 4. XI. wurden wieder 10 ccm 5n-Salzsäure + 2 g Pepsin, in 20 ccm Wasser gelöst, zugegeben.

Am 8. XI. wurde filtriert und das Filtrat mit 2n-Natronlauge versetzt, bis es schwach alkalisch auf Lackmuspapier, nicht aber auf Curcumapapier reagierte. 5 ccm der Lösung enthielten dann 54,1 mg Stickstoff, wovon 23,3% fo[illegible]ol-titrierbar waren.

Nun wurde Pankreatin „Rhenania" zugesetzt. [illegible]e-schah immer in der Weise, daß das Enzym (hier 2 g) [illegible] wenig Wasser gut verrührt in die Lösung eingegossen un[illegible] Schütteln verteilt wurde. Durch Zugabe von Toluol un[illegible] form wurde die Lösung gegen Bakterien gesch[illegible]

Am 12. XI. waren 38,3% des Sti[illegible] 2 g Pankreatin wurden zugesetzt[illegible]

Am 15. XI.: 42,2% Stickstoff[illegible] noch 2 g Pankreatin.

Am 22. XI.: 48,0% des Stick[illegible] dieser Lösung (Lösung A) wurden [illegible] Wasser verdünnt (gleich Lösung [illegible] 700 ccm Wasser verdünnt (gleich Lösung C). Die drei Lösungen wurden dann je für sich weiter verdaut.

Lösung A. Am 22. XI. wurden 200 ccm Darmpreßsaft + 2 g Pankreatin, am 25. XI. (62,6% des Stickstoffs formoltitrierbar) 100 ccm Darmpreßsaft, am 29. XI. (65,6% des Stickstoffs formoltitrierbar) 100 ccm Darmpreßsaft + 2 g Pankreatin, am 14. XII. (66,8% des Stickstoffs formoltitrierbar) 50 ccm Darmpreßsaft zugesetzt, und dann wurde die Lösung bis am 5. I. sich selbst überlassen.

Lösung B. Am 22. XI. wurden 50 ccm Darmpreßsaft + 1 g Pankreatin, am 25. XI. (69,3% des Gesamtstickstoffs formoltitrierbar) 25 ccm Darmpreßsaft, am 29. XI. (71,1% des

Stickstoffs titrierbar) 25 ccm Darmpreßsaft + 1 g Pankreatin, am 14. XII. (72,2 $^0/_0$ des Stickstoffs formoltitrierbar) 25 ccm Darmpreßsaft zugesetzt, und dann wurde die Lösung bis am 5. I. hingestellt.

Lösung C wurde ganz wie Lösung B behandelt, nur wurden außerdem am 20. XII. und am 29. XII. 40 ccm Darmpreßsaft zugefügt.

Am 5. I. 14 wurden die Lösungen analysiert. Die Resultate finden sich in Tabelle II und zeigen, daß in keiner der Lösungen ei[illegible] vollständiger Abbau eingetreten ist. Es sei über die Konze[illegible]tration hier bemerkt, daß

Lösung A	in	5 ccm	43,85 mg	Stickstoff	enthielt,
„ B	„	5 „	15,80 „	„	„
„ C	„	5 „	8,90 „	„	„

2. Versuche mit Eierklar.

[illegible]as Eierklar aus 10 Eiern wurde mit Pepsin und Salz-
s[illegible] wie beim Fleisch beschrieben, verdaut; nach etwas mehr
[illegible]ner Woche resultierte eine Lösung (Vol. ca. 1 l), die in
[illegible]3,90 mg Stickstoff enthielt, von dem 21,7 $^0/_0$ formol-
[illegible]erden konnten. Am 27. VI. 14 wurde die Lösung
[illegible]oben und mit Toluol, Chloroform und 2 g
[illegible]ersetzt. Am 2. VII. wurden 2 g Pan-
[illegible]ankreatin + 50 ccm Darmpreßsaft,
[illegible]tickstoffs formoltitrierbar) 50 ccm
[illegible] 16. VII. konnten 59,9 $^0/_0$ des Stick-
[illegible]. Ende Juli wurden noch 50 ccm
[illegible] Pankreatin zugesetzt, und darauf stand die Lösung 7 Monate im Thermostaten, um dann analysiert zu werden. Die Resultate finden sich in Tabelle II; sie zeigen, daß kein vollständiger Abbau erreicht ist.

3. Versuche mit Casein.

200 g Casein „Hammarsten" + 1 l Wasser + 5n-Salzsäure (bis die Reaktion hinreichend sauer wurde, vgl. beim Fleisch) + 5 g Pepsin „Armour" wurden am 21. IV. 14 in den Thermostaten gesetzt. Am 25. IV. wurde noch etwas Salzsäure (Probe wie oben) + 5 g Pepsin zugesetzt, und am 30. IV. wurde die Lösung neutralisiert; 25,6 $^0/_0$ des Stickstoffs waren formoltitrierbar. Es wurden Toluol, Chloroform und 2 g Pankreatin „Rhenania" zugegeben.

Am 4. V. waren 37,8 % des Stickstoffs formoltitrierbar; Zugabe von noch 2 g Pankreatin + 50 ccm Darmpreßsaft.

Am 13. V. konnten 48,5 % des Stickstoffs formoltitriert werden; Zugabe von 2 g Pankreatin + 50 ccm Darmpreßsaft.

Am 18. V.: 54,4 % formoltitrierbaren Stickstoffs. Es wurde 1 l Wasser + 2 g Pankreatin + 25 ccm Darmpreßsaft und am 22. V. sowie am 24. V. noch 25 ccm Darmpreßsaft zugesetzt.

Am 28. V. konnten 62,3 % des Stickstoffs formoltitriert werden. Es wurde mit Wasser bis auf ungefähr das doppelte Volumen verdünnt und dann mit 2 g Pankreatin + 50 ccm Darmpreßsaft und ferner am 2. VI. sowie am 6. VI. mit 50 ccm Darmpreßsaft versetzt.

Am 11. VI. enthielt die Lösung 68,8 % des Stickstoffs in formoltitrierbarer Form; 7,97 % waren als Ammoniak vorhanden. 2 g Pankreatin + 50 ccm Darmpreßsaft wurden hinzugefügt.

Nachdem am 4. VII. wieder Darmpreßsaft zugegeben worden war, enthielt die Lösung am 21. VII. 69,5 % des Stickstoffs in formoltitrierbarer Form. Es wurde noch mehr Darmpreßsaft zugesetzt, und dann stand die Lösung 7 Monate im Thermostaten. Die nachher durchgeführte Analyse findet sich in Tabelle II; die Lösung enthielt in 5 ccm 20,50 mg Stickstoff. Ein vollständiger Abbau ist nicht eingetreten.

Es ist möglich, daß die im Verdauungskanal selbst wirkenden Enzyme wirksamer sind, als die zu den oben beschriebenen Versuchen benutzten Handelspräparate. Es wurde daher ein Versuch ausgeführt, bei dem, wie im Versuche Cohnheims (l. c.), die Verdauung in dem Verdauungskanal eines Hundes eingeleitet wurde. Der Hund wurde mit Fleisch gefüttert, und durch eine in den Darm eingesetzte Kanüle konnte der Darminhalt herausgenommen werden, um darauf im Thermostaten weiter verdaut zu werden[1]). Es besteht somit die Möglichkeit einer besseren Verdauung; ferner ist es möglich, daß ein Teil der aus dem Fleisch zuerst abgespaltenen Aminosäuren resorbiert wird und somit die weiter folgende Verdauung nicht stört.

Herr Professor Möllgaard hatte die Güte, mir einen mit Darmfistel versehenen Hund für die Versuche zur Verfügung zu stellen, wofür ich auch hier meinen besten Dank abstatte.

[1]) Vgl. auch die Versuche von E. S. London und seinen Mitarbeitern in Zeitschr. f. physiol. Chem. 62 und 74.

30. IX. wurde eine Kanüle ins Jejunum, etwa 40 cm unterhalb der Flexura duodeno jejunalis, und am 21. XI. noch eine Kanüle etwa 1 m unterhalb der ersteren eingeführt. Am 30. XI. waren die Kanülen gut eingeheilt und ganz dicht; nur die letztere wurde bei den hier erwähnten Versuchen benutzt. Nachdem der Hund mehrmals mit Fleisch gefüttert worden war, wurde er kurze Zeit nach einer Fütterung im Gestell stehend angebracht, wo er ein paar Stunden bei geöffneter Kanüle stehen blieb; während dieser Zeit wurden in kleinen Gaben ein paar Hundert Gramm Fleisch verabreicht. Aus der Kanüle floß eine dunkle, sehr trübe Lösung, die schwach alkalisch reagierte; sie wurde mit Toluol und Chloroform versetzt, gut geschüttelt und im Thermostaten bei 37° aufbewahrt. Ein solcher Versuch wurde am 30. XI., am 1. XII. und am 3. XII. ausgeführt; es wurden in jedem Versuch etwa 150 bis 200 ccm erhalten. Nachdem die Lösungen einige Tage im Thermostaten verweilt hatten, wurden Proben zur Analyse entnommen. Wegen der dunklen Farbe der Lösungen war es notwendig, die zur Formoltitrierung kommenden Proben mit Silbernitrat zu entfärben (S. P. L. Sörensen und H. Jessen-Hausen, l. c.); die Entfärbung gelang einigermaßen. Über die Konzentration der Lösungen sei bemerkt, daß

Lösung 1 (vom 30. XI.) in 5 ccm 25,75 mg Stickstoff enthielt,
" 2 (" 1. XII.) " 5 " 15,60 " " "
" 3 (" 3. XII.) " 5 " 24,75 " " "

Die Resultate der Formoltitrierungen sind in Tabelle II aufgeführt; sie zeigen, daß kein vollständiger Abbau eingetreten ist.

Die 3 Lösungen wurden, weil kein deutlicher Unterschied vorhanden war, gemischt und filtriert, und das Filtrat wurde bis Anfang Januar im Thermostaten bei 37° stehen gelassen und dann analysiert. Es war kein weiterer Abbau erfolgt (siehe Tabelle II). Weil die Lösung jetzt auf Curcumapapier schwach alkalisch reagierte, wurde sie am 15. I. mit Salzsäure neutralisiert. Dann wurde am 15. I., sowie am 18. I. 10 ccm und am 21. I. 20 ccm Darmpreßsaft zugegeben, es folgte aber, wie die letzte Analyse zeigt (siehe Tabelle II), kein weiterer Abbau.

Es ist somit in keinem von den hier mitgeteilten, unter verschiedenen Bedingungen und mit verschiedenen Eiweißkörpern ausgeführten Versuchen gelungen, durch die bekannten

Tabelle II.

Die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffs und des Ammoniaks in Prozenten des Gesamtstickstoffs vor und nach vollständiger Hydrolyse mit Säuren.

Präparate		Vor der Hydrolyse		Nach der Hydrolyse		Vermehrung des Aminostickstoffs bei der Hydrolyse NH_2	Vermehrung des Ammoniakstickst. bei der Hydrolyse NH_3
		Menge des formol-titrierbar. Stickstoffs NH_2+NH_3	Menge des Ammo-niak-stickstoffs NH_3	Menge des formol-titrierbar. Stickstoffs NH_2+NH_3	Menge des Ammo-niak-stickstoffs NH_3		
Fleischlösung	A . . .	66,7	5,93			9,6	9,76
	B . . .	71,6	8,11	86,1	15,69	6,9	7,58
	C . . .	71,3	7,49			6,6	8,20
Eierklar . .		63,7	6,10	81,4	12,74	11,1	6,64
Caseinlösung	11. VI.	68,8	7,97	86,2	12,10	13,3	4,13
	21. VII.	69,5		87,1			
	24. III.	73,4	9,88	86,4	13,84	9,0	3,96
Produkt der Magen-Darm-Thermostaten-Verdauung	1 . .	64,9		86,5			
	2 . .	69,4		87,4			
	3 . .	63,6		86,6			
	. .	62,9	9,90	85,6	18,20	14,4	8,30
	. .	63,2	10,20	87,5	17,95	16,5	7,75

Verdauungsenzyme einen vollständigen Abbau eines Eiweißkörpers zu erreichen.

In dieser Beziehung muß bemerkt werden, daß es auch London nicht gelungen ist, den aus einer Darmfistel erhaltenen Chymus im Thermostaten zum vollständigen Abbau zu bringen, auch nicht wenn Darmsaft zugesetzt wurde[1]). Die Versuche von Abderhalden und Kramm[2]), bei denen sie durch Aufbewahrung des aus dem Darm von Schweinen erhaltenen Chymus im Thermostaten bei 37° schon nach 6 Stunden einen weitgehenden Abbau der Eiweißkörper erzielen konnten, sind in dieser Beziehung von weniger Bedeutung, denn ein Teil des Abbaus ist, wie die Verfasser selbst zugeben, wahrscheinlich auf die Wirkung der Darmbakterien, die nicht ausgeschaltet wurden, zurückzuführen.

Während in den letzten Jahren tiefabgebaute Eiweißkörper von vielen Forschern bei verschiedenen Untersuchungen verwendet worden sind, liegen Analysen derartiger Präparate nur

[1]) E. S. London und F. Rivosch-Sandberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 62, 455, 1909. — E. S. London und A. G. Rabinowitsch, ibid. 74, 305, 1911.

[2]) E. Abderhalden und F. Kramm, ibid. 77, 425, 1912.

sehr spärlich vor; außer den in hiesigen Laboratorien ausgeführten Analysen sind mir nur diejenigen von Abderhalden und Rona[1]), sowie die von Abderhalden[2]) unter Mitwirkung von Hanslian durchgeführten bekannt.

Abderhalden und Rona benutzten bei der Analyse dasselbe Verfahren wie oben geschildert, nur daß sie statt des Autoklavierens die Lösung 6 Stunden mit starker Salzsäure über freier Flamme kochten, was nach Henriques und Gjaldbäk (l. c. S. 15) für im voraus stark hydrolysierte Präparate wohl stets genügen wird. Es sind die Resultate der Analysen in Milligramm Stickstoff angeführt, die Angaben lassen aber eine Berechnung zu, um die Resultate in derselben Weise wie in Tabelle I und II anzugeben. Die Resultate dieser Berechnung sind in Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III.

Die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffs und des Ammoniaks in Prozenten des Gesamtstickstoffs vor und nach dem Kochen mit Salzsäure. Nach Abderhaldens und Ronas Analysen berechnet.

Präparate	Vor der Hydrolyse		Nach der Hydrolyse		Vermehrung des Aminostickstoffs bei der Hydrolyse NH_2	Vermehrung des Ammoniakstickst. bei der Hydrolyse NH_3
	Menge des formoltitrierbar. Stickstoffs NH_2+NH_3	Menge des Ammoniakstickstoffs NH_3	Menge des formoltitrierbar. Stickstoffs NH_2+NH_3	Menge des Ammoniakstickstoffs NH_3		
A	67,3	10,77	69,3	11,71	1,1	0,94
A_1	68,7	13,08	70,9	13,40	1,9	0,32
C	66,8	11,66	69,5	13,90	0,5	2,24
1	84,9	14,52	85,6	15,64	÷0,4	1,12
2	71,0	11,78	72,2	12,68	0,3	0,90
3	70,6	11,94	73,5	12,71	2,1	0,77
4	66,7	11,28	67,1	11,61	0,1	0,33
5	66,6	12,15	67,9	12,31	1,1	0,16
6	63,0	10,74	64,7	12,61	÷0,2	1,87
7	67,8	11,83	68,7	12,11	0,6	0,28
8	70,6	10,32	71,4	10,71	0,4	0,39

Es ist hier auffällig, daß die Präparate dieselbe Menge von formoltitrierbarem Stickstoff, aber erheblich mehr Ammoniak und somit erheblich weniger Aminogruppen enthalten als diejenigen, über die im vorhergehenden berichtet worden ist. Es wäre zu erwarten, daß das Kochen mit Säure die Menge der Aminogruppen bedeutend vermehrt hätte; dies ist aber nicht

[1]) E. Abderhalden und P. Rona, ibid. 67, 410, 1910.
[2]) E. Abderhalden, ibid. 77, 56, 1911.

geschehen; die Vermehrung ist von solcher Größe, daß sie unberücksichtigt bleiben muß. Es sollte aber dann vollständig abgebautes Fleisch, in dem nur wenig mehr als die Hälfte des Stickstoffs als Aminogruppen vorhanden war, vorliegen, was nach allem, was wir über diese Verhältnisse wissen, als sehr unwahrscheinlich zu betrachten ist. Was diese Resultate verursacht hat, läßt sich wohl nicht entscheiden, jedoch dürfen sie nicht als Beweis für den vollständigen Abbau der Eiweißkörper durch Enzyme betrachtet werden.

Bei den später veröffentlichten Versuchen hat Abderhalden (l. c.) statt der Formoltitrierung die Methode von Van Slyke benutzt. In der oben zitierten Abhandlung von Abderhalden und Kramm wird mitgeteilt, daß ein Vergleich zwischen den beiden Methoden ausgeführt worden ist, wodurch es sich herausstellte, daß die Resultate der Formoltitrierung höher ausfallen als diejenigen der Van Slykeschen Methode, wenn die Einwirkung der salpetrigen Säure auf 5 Minuten beschränkt wird; dauert die Einwirkung dagegen 10 Minuten, dann werden die Resultate höher als bei der Formoltitrierung. Nach allem, was wir über die in den Eiweißkörpern vorkommenden Aminosäuren wissen, ist dies aber ganz unverständlich. Betrachten wir die einzelnen Aminosäuren, so wissen wir aus den Untersuchungen von Sörensen und von Van Slyke, daß die α-Aminogruppen sich glatt formoltitrieren lassen und bei 20° in 6 Min. mit salpetriger Säure glatt zerlegt werden; hier kann somit kein Unterschied von Bedeutung vorhanden sein. Die Guanidogruppe des Arginins, die Imidazolgruppe des Histidins und die Indolgruppe des Tryptophans reagieren nach keiner der beiden Methoden; es kann somit auch hier kein merkbarer Unterschied vorhanden sein. Ein solcher wird dagegen bei Lysin, Prolin und Ammoniak vorliegen.

Das Ammoniak reagiert nur langsam mit salpetriger Säure, so daß lange Zeit erforderlich ist, um die Reaktion zu vervollständigen, während es bei der Formoltitrierung glatt reagiert; das Vorhandensein von Ammoniak wird somit bei der Formoltitrierung höhere Resultate bedingen können. Übrigens ist die Spaltbarkeit des Ammoniaks nach Van Slyke in dem Grade von der Temperatur, der Zeit der Einwirkung und der Konzentration abhängig, daß es unbedingt zu entfernen ist,

wenn es in nicht zu vernachlässigender Menge vorkommt; dies wird leider nicht immer getan.

Lysin reagiert bei der Formoltitrierung glatt mit den beiden Aminogruppen, während die ε-Aminogruppe nach Van Slyke nur langsam reagiert; um die Reaktion sicher quantitativ zu gestalten, muß man die salpetrige Säure 15 bis 30 Minuten, je nach der Temperatur, einwirken lassen. Wenn dies nicht geschieht, wird das Vorhandensein des Lysins somit höhere Resultate bei der Formoltitrierung als bei der Van Slykeschen Aminogruppenbestimmung verursachen.

Prolin reagiert überhaupt nicht mit salpetriger Säure, dagegen wird es, obwohl es keine Aminogruppe enthält, bei der Formoltitrierung, wenn auch nicht quantitativ, mitbestimmt. Auch dieser Unterschied wird somit bewirken, daß die Resultate bei der Formoltitrierung höher als bei der Van Slykeschen Methode ausfallen. Wahrscheinlich gilt dasselbe auch von dem Oxyprolin.

Der Vollständigkeit wegen sei bemerkt, daß Tyrosin bei der Formoltitrierung mit etwas mehr als 100 % des Stickstoffs reagiert, während Glykokoll und Cystin bei der Van Slykeschen Methode dasselbe tun. Diese Abweichungen sind doch nur klein, und weil sie bewirken, daß die Bestimmungen nach den beiden Methoden etwas zu hoch ausfallen, werden sie gewöhnlich nicht zu einer merkbaren Differenz Anlaß geben.

Wenn wir ein Gemisch der verschiedenen Aminosäuren nach den beiden Methoden untersuchen, müssen wir somit erwarten, bei der Formoltitrierung mehr Aminostickstoff als bei der Van Slykeschen Methode zu finden, sei es, daß die Einwirkung der salpetrigen Säure 6 Minuten oder längere Zeit dauert. Dies wird auch durch die folgenden Versuche bestätigt.

Es wurde eine Lösung von 15 g Erepton II (Tabelle I) in 500 ccm Wasser hergestellt. 200 ccm dienten zur Ausführung der beiden, in Tabelle I angeführten Analysen.

1. 10 ccm wurden mit Wasser bis auf 50 ccm verdünnt und die Lösung dann in Portionen von je 10 ccm zur Analyse nach Van Slyke verwandt; das Ammoniak ist somit nicht entfernt worden. Die Resultate waren die folgenden:

10 ccm lieferten in 6 Min.

bei 23° 9,35 ccm N = 64,4 % des Gesamt-N's

10 ccm lieferten in 12 Min.

bei 23° 10,50 ccm N = 72,5 % des Gesamt-N's

Die Formoltitrierung ergab 76,2 % " "

2. 50 ccm der ursprünglichen Lösung wurden wie gewöhnlich mit Salzsäure autoklaviert und dann zur Trockne verdampft. Der Rest wurde in Wasser gelöst und die Lösung bis auf 50 ccm verdünnt. 10 ccm dieser Lösung wurden dann annähernd neutralisiert, bis auf 50 ccm verdünnt und zur Analyse nach Van Slyke benutzt; das Ammoniak ist somit nicht entfernt worden. Die Resultate waren:

10 ccm lieferten in 6 Min.

bei 23° 11,2 ccm N = 77,4 % des Gesamt-N's

10 ccm lieferten in 12 Min.

bei 23° 12,0 ccm N = 83,0 % " "

Die Formoltitrierung ergab 88,3 % " "

3. 50 ccm der ursprünglichen Lösung wurden mit überschüssigem, methylalkoholischem Baryt im Vakuum bei einer im Wasserbade 40° nicht übersteigenden Temperatur zur Trockne verdampft. Der Rest wurde mit Wasser und einem kleinen Überschuß von Salzsäure bis auf 50 ccm gelöst. 10 ccm dieser Lösung wurden annährend neutralisiert, bis auf 50 ccm verdünnt und zur Analyse nach Van Slyke benutzt; die Lösung ist dann ammoniakfrei.

Die Ergebnisse sind die folgenden:

10 ccm lieferten in 6 Min.

bei 23° 9,4 ccm N = 64,7 % des Gesamt-N's

10 ccm lieferten in 12 Min.

bei 23° 9,8 ccm N = 67,6 % " "

Die Formoltitrierung ergab . 68,9 % " "

(Berechnet aus der ersten Formoltitrierung und der Ammoniakbestimmung 76,2 ÷ 6,38 = 69,8 %).

4. 50 ccm der ursprünglichen Lösung wurden mit Salzsäure wie gewöhnlich autoklaviert und zur Trockne verdampft. Der Rest wurde in Wasser gelöst und die Lösung ganz wie bei 3. angegeben behandelt. Es liegt somit auch hier eine ammoniakfreie Lösung vor.

10 ccm lieferten in 6 Min.

bei 23° 10,2 ccm N = 69,6 % des Gesamt-N's

10 ccm lieferten in 12 Min.

bei 23° 10,9 ccm N = 74,5% des Gesamt-N's

Die Formoltitrierung ergab . 76,5% " "

(Berechnet 77,8%).

Ein ähnlicher Versuch wurde mit der Caseinlösung (Tabelle II) in ganz derselben Weise angestellt. Die Resultate waren:

Die vorliegende Lösung:

Nach Van Slyke in 7 Min.	(17°)	57,0%	des Gesamt-N's
" " " " 14 "	(16,5°)	63,8%	" "
" " " " 31 "	(17,5°)	68,7%	" "
Formoltitrierung		73,4%	" "

Dieselbe nach dem Autoklavieren:

Van Slyke in 7 Min.	(17°)	65,0%	des Gesamt-N's
" " " 14 "	(16°)	71,8%	" "
" " " 31 "	(16,5°)	79,5%	" "
Formoltitrierung		86,4%	" "

Die ursprüngliche Lösung nach der Entfernung des Ammoniaks:

Van Slyke in 7 Min.	(17°)	48,1%	des Gesamt-N's
" " " 14 "	(17,5°)	53,3%	" "
" " " 31 "	(17°,5)	58,9%	" "
Formoltitrierung		63,8%	" "

Nach dem Autoklavieren und der darauf folgenden Entfernung des Ammoniaks:

Van Slyke in 7 Min.	(18°)	57,5%	des Gesamt-N's
" " " 14 "	(18°)	66,6%	" "
" " " 31 "	(18°)	69,4%	" "
Formoltitrierung		72,6%	" "

Es hat sich somit ergeben, wie auch zu erwarten war, daß die Formoltitrierung bei der Untersuchung eines Verdauungsprodukts einen höheren Gehalt an Aminopruppen (bzw. an Aminogruppen + Ammoniak) ergibt als die Van Slykesche Methode.

Es fragt sich nun, ob die beiden Methoden als gleichwertig zu betrachten sind. Dies ist dahin zu beantworten, daß in Lösungen, die nur Aminosäuren enthalten, die beiden Methoden gewöhnlich mit gleich gutem Erfolg benutzt werden können; es ist jedoch zu bemerken, daß während mit der Formoltitrierung mit einiger Übung sehr konstante Resultate erhalten werden können, dies bei der Van Slykeschen Methode nur dann der

Fall ist, wenn die Einwirkung der salpetrigen Säure so lange ausgedehnt wird, bis das Lysin zerlegt worden ist, sonst sind die Resultate zu sehr von Temperatur und Zeit der Einwirkung abhängig. Wenn die Menge des Ammoniaks bedeutend kleiner ist als die Menge des Aminostickstoffs, läßt sich durch Formoltitrierung die Summe dieser beiden leicht bestimmen[1]), und wenn die Ammoniakmenge bekannt ist oder bestimmt wird, ergibt sich aus der Differenz die Menge des Aminostickstoffs. Bei der Van Slykeschen Methode muß dagegen das Ammoniak vor der Bestimmung entfernt werden, denn sonst ergibt sich aus der Analyse die Menge des Aminostickstoffs + ein Bruchteil des Ammoniakstickstoffs, ein Bruchteil, der unbekannt ist, und zwar von Temperatur, Zeit der Einwirkung und Konzentration abhängt; die Ammoniakmenge, die unter Stickstoffentwickelung zerfällt, kann, wie die oben angegebenen vergleichenden Versuche ergeben, recht erheblich sein.

Sind komplizierter gebaute Körper von unbekannter Art in der zu untersuchenden Lösung vorhanden, so ist die Formoltitrierung wohl am sichersten; denn wir wissen, daß verschiedene Polypeptide sich der Van Slykeschen Methode gegenüber abnorm verhalten, indem zuviel Gas entwickelt wird[2]), d. h. zu hohe Resultate erhalten werden.

Einen Vorzug hat die Van Slykesche Methode vor der Formoltitrierung darin, daß die Farbe der zu untersuchenden Lösung gleichgültig ist. Dies ist aber gewöhnlich von weniger Bedeutung, indem die zur Untersuchung kommenden Lösungen gewöhnlich unschwer so weit entfärbt werden können (Sörensen und Jessen-Hansen, l. c.), daß die Titrierung sich leicht durchführen läßt. Außerdem nimmt die Entfärbung viel weniger Zeit in Anspruch, als notwendig ist, um das Ammoniak aus der Lösung zu entfernen; bei vergleichenden Untersuchungen, oder überhaupt bei solchen, wo es nur darauf ankommt, die Menge des Amino- + Ammoniakstickstoffs festzustellen, ist die Formoltitrierung somit auch die Methode, die am wenigsten Zeit fordert.

---

[1]) V. Henriques und S. P. L. Sörensen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 120, 1909.

[2]) E. Abderhalden und D. D. Van Slyke, Zeitschr. f. physiol. Chem. 74, 505, 1911.

Nach allem, was über die beiden Methoden bekannt ist, dürfte es daher empfehlenswert sein, bei derartigen Untersuchungen, wie den hier in Frage stehenden, immer die Formoltitrierung vorzuziehen. Wo diese aus irgendeinem Grunde — Vorhandensein von Essigsäure oder anderen schwachen Säuren, nicht zu beseitigende Farbe der zu untersuchenden Lösung o. a. — nicht benutzt werden kann, wird die Van Slykesche Methode gute Dienste leisten können.

Mit der Van Slykeschen Methode hat Abderhalden einige durch Verdauung verschiedener Eiweißkörper erhaltene Präparate untersucht und die Resultate der Analysen veröffentlicht[1]). Es ist leider nicht angegeben, ob die Analysen im Van Slykeschen Apparat mit ammoniakfreien oder ammoniakhaltigen Lösungen ausgeführt worden sind, was für die Deutung der Resultate von Wichtigkeit ist. Sind die Analysen mit ammoniakfreien Lösungen ausgeführt, dann zeigen die Resultate, daß einige von den Präparaten als vollständig abgebaut betrachtet werden müssen; es ist dann zu bedauern, daß es nicht angegeben ist, in welcher Weise sie dargestellt worden sind.

Daß es nicht leicht gelingt, einen vollständigen Abbau zu erreichen, ergibt sich schon daraus, daß nicht alle Abderhaldenschen Präparate, die doch wohl in derselben Weise gewonnen wurden, völlig abgebaut sind. Wenn es sich herausstellen sollte, daß es nicht immer, sondern nur in einigen Fällen gelingt, zu vollständig abgebauten Präparaten zu kommen, dann ist die Möglichkeit nicht sofort von der Hand zu weisen, daß es sich hier um die Mitwirkung von Bakterien handelt, denn wenn größere Proteinmengen auf einmal verdaut werden sollen, ist es sehr schwer, die Bakterien völlig auszuschalten. Trotzdem wir immer von Anfang der Verdauung an reichlich Toluol zusetzten (siehe oben), konnten wir bei einigen unserer Präparationen plötzlich Gasentwicklung im Verdauungsgemisch konstatieren, die von einem deutlichen Fäulnisgeruch begleitet war. Wurde dann das Gemisch mit einem reichlichen Überschuß an Chloroform und Toluol tüchtig geschüttelt und das Umschütteln oft wiederholt, dann ließen sich gewöhnlich die

---

[1]) E. Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chem. 77, 56, 1911.

Fäulniserreger beseitigen; einmal — wo reichlich ungelöstes Fleisch noch vorhanden war — ist es aber geschehen, daß die Fäulnis so stark einsetzte und so spät entdeckt wurde, daß die Zugabe von Chloroform und Toluol nicht die gewünschte Wirkung hatte, und es war nichts anderes zu tun, als die ganze Masse zu verwerfen. Es wurde daher immer die Verdauung in Flaschen von solcher Größe durchgeführt, daß ein kräftiges Umschütteln in den Händen möglich war, und das Umschütteln wurde sehr oft wiederholt. Geschieht dies nicht, kann die Anwesenheit der Bakterien in irgendeinem Stadium der Verdauung nicht ausgeschlossen werden, und dann liegen selbstverständlich ganz andere Bedingungen für den Abbau vor.

Weil es bei vielen Versuchen von Wichtigkeit ist, möglichst tief abgebaute Eiweißkörper in solcher Weise herstellen zu können, daß sekundäre Spaltungen möglichst ausgeschlossen sind, wäre es wünschenswert, zu erfahren, in welcher Weise die nach den Angaben Abderhaldens völlig abgebauten Eiweißkörper hergestellt werden. Die schon im Jahre 1910 in Aussicht gestellte Veröffentlichung hat meines Wissens bis jetzt nicht stattgefunden, und das vom Höchster Farbwerke nach den Angaben Abderhaldens hergestellte Fleischpräparat Erepton, das als vollständig abgebaut bezeichnet wird, ist nicht vollständig abgebaut.

Es erhellt aus den hier mitgeteilten Versuchen, daß es sehr schwer, wenn überhaupt möglich ist, durch Enzyme allein einen vollständigen Abbau der Eiweißkörper außerhalb des tierischen Organismus zu erreichen, und daß die durch Einwirkung von Säuren auf möglichst tief abgebaute Eiweißkörper erreichte vollständige Hydrolyse neben der Vermehrung des Aminostickstoffs mit einer erheblichen Vermehrung des Ammoniaks verbunden ist. Über den Ursprung dieses Ammoniaks wird in einer folgenden Mitteilung berichtet werden.

Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. XIX.

Über Neutralsalzeiweißverbindungen.

Von

Thaddäus Oryng und Wolfgang Pauli.

(Aus dem Laboratorium für physikalisch-chemische Biologie der K. K. Universität Wien.)

(Eingegangen am 23. Mai 1915.)

Mit 3 Figuren im Text.

Bereits O. Nasse[1]) hat auf die Möglichkeit von Eiweißsalzverbindungen hingewiesen. Durch die systematischen Untersuchungen Paulis und seiner Schüler, der schon vor längerer Zeit[2]) anläßlich seines Studiums der Löslichkeitsbedingungen des Globulins eine engere Verbindung des Eiweiß mit den Salzionen angenommen hat, wurde die Existenz von Eiweißneutralsalzverbindungen in hohem Grade wahrscheinlich gemacht. Diese Versuche stützten sich auf die Einwirkung, welche Neutralsalze schon in niederen Konzentrationen auf die Hitze und Alkoholkoagulation, sowie die innere Reibung reiner Eiweißlösungen ausüben[3]).

Die obige Annahme Paulis hat erst durch neuere Versuche aus seinem Institute von K. Manabe und J. Matula[4]) eine direkte Prüfung und Bestätigung gefunden, indem diese

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. **41**, 504, 1887.

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. **78**, 315, 1899 und Anz. d. Kais. Akademie der Wissensch. 12. Oktober 1899.

[3]) Die systematischen Versuche von W. Bayliss über die schwere Entfernung letzter Salzanteile aus Glutin durch Waschen (Biochem. Journ. **1**, 175, 1906), sowie die Beobachtung W. B. Hardy's (Journ. of Physiol. **33**, 251, 1905) über eine mäßige Herabsetzung der elektrischen Leitfähigkeit von Salzlösungen durch Globulin sind für unseren Fall nicht genug eindeutig.

[4]) Diese Zeitschr. **52**, 369, 1913.

Autoren entgegen den älteren Beobachtungen von Bugarzsky und Liebermann[1]), sowie den neuen von P. Rona[2]) und der ablehnenden Haltung R. Höbers[3]), eine Chloraufnahme aus wässerigen Kaliumchloridlösungen durch amphoteres[4]) Eiweiß in mehreren Versuchen elektrometrisch nachgewiesen haben.

Die gelegentlichen[5]) Beobachtungen Manabes und Matulas erstreckten sich nur auf ein kleines Material und waren auch einiger methodischen Ergänzung bedürftig. In Anbetracht der großen Bedeutung dieser Frage war es wünschenswert, die Versuche Manabes und Matulas auf breiterer Grundlage zu wiederholen. Im folgenden sind derartige Versuche beschrieben und erörtert.

Untersucht wurde das Verhalten von verschiedenen Eiweißkörpern (hoch dialysiertes Rinderserum, gereinigtes Rinderalbumin, Glutin und Desaminoglutin) gegenüber wässerigen Lösungen von Chloriden, in der Regel Kaliumchlorid, mittels Messung der durch Eiweiß hervorgerufenen Änderungen im Chlorionengehalte der Lösungen. Die Beobachtungen wurden ergänzt durch Versuche an einigen einfachen Amidosäuren und am Harnstoff.

Die Messungen geschahen mit der ausführlich in der zitierten Abhandlung Manabes und Matulas beschriebenen elektrometrischen Methode. Als konstante Bezugselektrode diente immer dieselbe mit $^n/_1$-Kaliumchlorid gefüllte Kalomelelektrode, als Normalelement ein Kadmiumelement von 1,0186 V. Es wurden, um nur mit möglichst geringen Mengen der verhältnismäßig kostbaren Flüssigkeiten auszukommen, unten stark verjüngte Elektroden von ca. 5 ccm Volumenkapazität angewendet. Jeder Eiweiß- usw. Versuch wurde durch einen parallelen Nullversuch mit reiner Salzlösung kontrolliert. Auch wurde stets die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse geprüft.

Die Potentialdifferenz zwischen dem Quecksilber und einer mit Kalomel gesättigten Lösung ist abhängig von der vorhan-

---

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 72, 51, 1898.

[2]) Diese Zeitschr. 29, 501, 1910.

[3]) Physik. Chemie der Zelle und Gewebe, 3. Aufl., 1911, S. 164.

[4]) W. Pauli und H. Handovsky, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 11, 415, 416, 1908.

[5]) l. c. S. 400 u. ff.

denen Konzentration der freien Mercuroionen. Sie wird sich also durch alle die Mercuroionenkonzentration beeinflussenden Bedingungen ändern. Zu diesen Bedingungen gehört auch die Anwesenheit von anderen Chloriden in der Lösung. Diese werden je nach ihrer Lösungskonzentration und Dissoziationsgröße die Konzentration der freien Mercuroionen vermindern oder vergrößern. Diese Abhängigkeit der Mercuroionenkonzentration von der Chlorionenkonzentration gibt uns ein Mittel an die Hand, durch die direkte Messung von Mercuroionenkonzentration auf die vorhandene Chlorionenkonzentration zu schließen. Die zureichende und notwendige Bedingung dafür ist die Konstanz des Löslichkeitsproduktes von Kalomel. Bei Zufügung von Eiweiß wird man eine solche von vornherein nicht unbedingt annehmen. So wurde von Pauli und M. Samec[1]) eine Löslichkeitserhöhung von schwer löslichen Elektrolyten durch Eiweißkörper beobachtet. Die Bildung von Salzioneneiweißkomplexen[2]), die möglicherweise das Löslichkeitsprodukt des Kalomels nicht beeinflussen, ist nur eine theoretische Auslegung des Tatsächlichen. Würde aber die Löslichkeit von Kalomel in wässerigen Eiweißlösungen ohne Entstehung einer neuen Verbindung in der Tat erhöht, so müßte die elektromotorische Kraft der Kalomelelektrodenkette trotz des erhöhten Gehaltes an Chlorion (was bei Konstanz des Löslichkeitsproduktes des Kalomels eine Verminderung der elektromotorischen Kraft zur Folge hätte) infolge der neugebildeten Mercuroionen eine Erhöhung erfahren. In diesem Falle wären sichere Schlüsse auf die Chlorionenkonzentration unmöglich.

Eine Beeinflussung der Kalomellöslichkeit infolge Dispersitätsverschiedenheit des Kalomels, wie dies für die Silber-Silberchloridkette von Z. Glówczyński[3]) beobachtet wurde, ist kaum zu befürchten. Es spricht dagegen die mit ganz wenigen Ausnahmen gute Reproduzierbarkeit der Versuche. Verschiedenheiten in der Klärung der Kalomelaufschwemmung in unseren Versuchen legen die Möglichkeit von Dispersitätsänderungen am Kalomel nahe. Direkte Versuche, in welchen der Einfluß der Dauer des Schüttelns von Kalomel mit den Unter-

[1]) Diese Zeitschr. 17, 235, 1909.
[2]) Pauli und Samec, l. c. S. 247.
[3]) Kolloidchem. Beihefte 6, 117, 1914.

suchungsflüssigkeiten geprüft wurde, ergaben kleine aber nicht streng reproduzierbare Unterschiede in den beobachteten elektromotorischen Kräften. Um diesen, wenn auch ganz geringfügigen Einfluß auszuschalten, wurde die Kalomelpaste in größerem Vorrate hergestellt und immer auf dieselbe Weise mit der zu untersuchenden Flüssigkeit gerührt.

Störungen im Sinne der Entstehung von Komplexanionen $HgCl_x$ wo $x \geqslant 3$, wie solche G. S. Forbes[1]) bei Zusatz von Chloriden für Silberchlorid angenommen hat, sind nicht ausgeschlossen[2]). Dafür könnte der Umstand sprechen, daß unsere Werte der elektromotorischen Kräfte in einem Koordinatensystem: E.M.K.K. und Chlorionenexponenten nicht auf einer Geraden liegen, sondern bei niedrigeren Chlorionkonzentrationen schwach konkav gegen die Chlorionenexponentenachse verlaufen. Dieser Fall berührt keineswegs die Konstanz des Löslichkeitsproduktes von Kalomel, er könnte aber die Resultate insoweit verdecken, als die beispielweise an das Eiweiß tatsächlich gebundenen Chlormengen um einen kleinen mit der Kaliumchloridkonzentration wechselnden Betrag von der gemessenen Chloraufnahme abweichen. Ein daraus entstandener Fehler würde den gefundenen Wert von Chloraufnahme an Eiweiß etwas zu klein ergeben.

Versuche mit dialysiertem Serum.

Zur Verwendung gelangte ein sieben Wochen hindurch dialysiertes Rinderserum mit einem Trockengehalte von 1,27 %. Es wurde vorerst der Chlorionengehalt einer aus Serum und Kalomelpaste bestehenden Mischung untersucht. Dabei wurde, ebenso wie weiter bei Gelatine, Albumin und Desaminoglutin, eine gegen eine Vergleichsprobe mit unserem destillierten Wasser[3])

[1]) Journ. of the Am. Chem. Soc. 33, 1937, 1911.

[2]) Die elektrometrischen Messungen Glówczyńskis sprechen jedoch nicht für eine Bildung von komplexen Silberionen.

[3]) Die Bestimmung der elektromotorischen Kraft von destilliertem Wasser mit Kalomel stieß auf Schwierigkeiten. Die elektromotorische Kraft der Kette nahm nämlich mit der Zeit merklich bis zu einem Endwert zu. Zur Veranschaulichung möge folgender Versuch dienen:

Zeit	E.M.K.	C_{Cl}
Erste Messung . . .	0,2109	$1,65 \times 10^{-4}$
4 Stunden	0,2155	$1,38 \times 10^{-4}$
24 Stunden	0,2311	$0,74 \times 10^{-4}$

starke Abnahme der elektromotorischen Kraft beobachtet. Darüber gibt Tabelle I eine Orientierung.

Tabelle I.

1,27 % Rinderserum ohne KCl-Zusatz.

E.M.K.	C_{Cl}	P_{Cl}
0,1844	$4,77 \times 10^{-4}$	3,322
0,1830	$5,04 \times 10^{-4}$	3,298
0,1888	$3,99 \times 10^{-4}$	3,399
0,1878	$4,16 \times 10^{-4}$	3,381
0,1923	$3,48 \times 10^{-4}$	3,459
0,1864	$4,40 \times 10^{-4}$	3,357
Mittelwert:	$4,31 \times 10^{-4}$	

Mittel aus den Endwerten des entsprechenden destillierten Wassers: C_{Cl} $0,7 \times 10^{-4}$.

In dieser und in den folgenden Tabellen ist P_{Cl} der Chlorionenexponent (analog Sörensens[1]) Wasserstoffionenexponenten) und C_{Cl} der Normalitätsfaktor der Lösung in bezug auf ihre Chlorionen. Die Berechnung geschah durch Extrapolieren aus dem Werte einer nächstliegenden Kaliumchloridlösung von bekannter Chlorionenkonzentration nach der Formel $P_{Cl_1} = P_{Cl_2} + \frac{\pi_1 - \pi_2}{K}$, oder, wie z. B. in Tabelle I, wo solche genug naheliegende Werte nicht vorkommen, mit Hilfe des π_0-Wertes, das ist des Wertes der elektromotorischen Kraft, die der Chlorionenkonzentration 1 entspricht. π_0 ist nach der Berechnung von Manabe und Matula[2]) für eine $^1/_1$ normale Kaliumchloridkalomelelektrode bei Zimmertemperatur gleich 0,0072598 V. und K wurde gleich 0,0577 gesetzt.

Aus der Tabelle I folgt, daß bei Zusammenbringen unseres Serums mit Kalomelpaste ein Gehalt an Chlorionen von $4,31 \times 10^{-4}$ n resultiert (nach 2 Stunden, siehe Fußnote 3 S. 371), während die entsprechenden Messungen an dem verfügbaren destillierten Wasser nach 24 Stunden einen Gleichgewichtswert

Diese Erscheinung, die noch einer Aufklärung bedarf, kommt auch bei mit sehr niedrigen Chlorionenkonzentrationen versetztem Serum vor, das Gleichgewicht stellte sich aber schon nach 2 Stunden praktisch ein. Die zeitliche scheinbare Abnahme der Chlorionenkonzentration und die beobachtete Zunahme der elektromotorischen Kraft, die wohl auf langsamer Sättigung mit Merouroionen beruhen, können mit größerer Deutlichkeit erst bei niedrigerer Chlorionenkonzentration zum Vorschein kommen. Zu sämtlichen Versuchen diente Paulis Elektrodenform für Flüssigkeiten hohen Widerstandes.

[1]) S. P. L. Sörensen, Messung und Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration usw. Ergebn. d. Physiol. **1902**, 12. Jahrg.

[2]) l. c. S. 377.

von 0,2311 V. aufweisen, was einem Gehalte von Chlorionen $0{,}74 \times 10^{-4}$ n entspricht. Die hohe Reinheit unseres Serums insbesondere unseres Rinderalbumins und das später zu besprechende Verschwinden[1]) von Chlorionen nach Zusatz von Schwefelsäure (s. u.), machen es höchst unwahrscheinlich, daß der Chlorionenzuwachs beim Zusammenbringen von Eiweiß mit Kalomel vom Serum herrührt. Wir haben es vielmehr mit einer durch Serumanwesenheit hervorgerufenen Neuentstehung von Chlorionen zu tun. Diese Chlorionenbildung beträgt ca. $3{,}6 \times 10^{-4}$ Mol im Liter.

Aus der Zusammenstellung in der Tabelle I, wie auch aus entsprechenden, unten beschriebenen Versuchen mit anderen Eiweißkörpern, folgt zunächst, daß durch die Anwesenheit von Eiweiß das Löslichkeitsprodukt von Kalomel nicht erhöht wird, da sonst eine infolge der Anreicherung der Lösung an Mercuroionen erhöhte elektromotorische Kraft zu beobachten wäre, was nicht der Fall ist. So liefern diese Versuche[2]), ebenso wie diejenigen mit Gelatine, Albumin und Desaminoglutin (s. u.) einen direkten Beweis zugunsten der Theorie von Pauli und Samec (l. c. S. 247), nach welcher die erhöhte Löslichkeit der schwer löslichen Salze bei Anwesenheit von Eiweiß auf einer Reaktion zwischen Eiweiß und Salz beruht. Diese Reaktion führt in unserem Falle zu einem inneren[3]) komplexen Quecksilbereiweißsalze. In unseren Versuchen kann ferner eine Dissoziation von Metallionen aus dem komplexen Salze mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis steht in guter

---

[1]) Durch geringen Zusatz etwa von Salzsäure zum Eiweiß werden die Chlorionen nicht vermindert, weil nach Versuchen von Manabe und Matula (l. c.) in der niederen Konzentration zunächst keine merkliche Bindung derselben erfolgt (S. 386).

[2]) Ähnliche Versuche wurden von uns auch mit der Ag/AgCl-Elektrode (nach Jahn, Zeitschr. f. physik. Chemie **33**, 554, 1900 hergestellt) ausgeführt. Auch hier wurde eine kleinere elektromotorische Kraft, das heißt eine größere Chlorionenkonzentration, bei Eiweißzusatz beobachtet. Die betreffenden Unterschiede waren aber viel kleiner als bei der Kalomelelektrode. Die Benutzung von Silberelektroden erwies sich trotz deren anscheinender Einfachheit für unsere Zwecke nicht empfehlenswert, weil sich hier das Gleichgewicht zu langsam einstellt und außerdem noch Störungen infolge der Bildung von Adsorptionsschichten an der Elektrodenoberfläche hinzukamen.

[3]) A. Werner, Neuere Anschauungen etc., III. Aufl., 287, 1913.

Übereinstimmung mit den Versuchen von Pauli und L. Flecker[1]) über die Eiweißverbindungen mit Schwermetallsalzen.

Sieht man von einem undissoziierten Anteil des Quecksilbereiweißkomplexes ab, so kann man als Minimum der vom Eiweiß aufgenommenen Mercuroionen eine den neu entstandenen freien Chlorionen äquimolekulare Menge ansetzen, also $3,6 \times 10^{-4}$ Mol im Liter. Da unser Serum $1,27\,^0/_0$ Eiweiß enthält, so bedeutet dies, daß 12,7 g Eiweiß eine Menge von $3,6 \times 10^{-4}$ Mol Quecksilber oder $3,6 \times 10^{-4} \times 200,6 = 0,072$ g Quecksilber binden; oder es wird 1 g Quecksilber durch 176 g Eiweiß festgehalten. Würde nur ein Molekül Eiweiß mit einem Molekül Kalomel in Reaktion treten, so würde dies bedeuten, daß das Eiweißmolekül rund 180 mal größer ist als das Quecksilberatom. Das Verbindungsgewicht Eiweiß wäre dann ungefähr gleich 35000. Da dieser Wert wahrscheinlich viel zu hoch ist, so ist anzunehmen, wofür auch anderweitige Erfahrungen sprechen, daß an mehreren Stellen des Eiweißmoleküls Quecksilberatome eintreten.

Aus der Tatsache, daß ein Gemisch Eiweißkalomel einen im Vergleich zu destilliertem Wasser höheren Gehalt an Chlorionen zeigt, folgt weiter, daß die Versuche über die Aufnahme von Chlor zugesetzter Chloride durch Eiweißkörper stets einer entsprechenden Korrektur bedürfen. Diese Korrektur kann ohne einen merklichen Fehler, wie aus den Versuchen über den Einfluß von Neutralsalzzusatz (s. u. bei den Glutinversuchen) auf die Bindung von Chlorionen zu ersehen ist, für alle Kaliumchloridkonzentrationen als gleich gesetzt werden. Im Falle eines Serums vom Gehalte $1,27\,^0/_0$ ist diese Korrektur ca. $3,6 \times 10^{-4}$ zu nehmen, d. h. es sind die anfänglichen Chlorionenkonzentrationen oder die direkt beobachteten gebundenen Chlormengen um den Wert $3,6 \times 10^{-4}$ zu erhöhen. In der Tabelle III ist diese Korrektur entsprechend dem kleineren Eiweißgehalte in den Mischungen gleich $3,26 \times 10^{-4}$ gesetzt.

In der Tabelle II sind die Serumversuche mit Kaliumchloridzusatz zusammengestellt. Zum besseren Verständnis der Ergebnisse sind neben den elektromotorischen Kräften (E.M.K.K.) der Serumversuche auch die entsprechenden E.M.K.K. der zu-

[1]) Diese Zeitschr. **41**, 461, 1912.

gehörigen reinen Kaliumchloridlösungen angegeben, die gleichzeitig mit jeder Serumprobe als Nullversuche gemessen wurden.

Tabelle II.

Serum 1,14 % und KCl.

KCl n	Nullversuche			Serumversuche			Gebundenes Chlor n
	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	
0,10	0,05110	1,0651	0,08609	0,05233	1,0864	0,08196	$0,41 \times 10^{-2}$
0,05	0,06784	1,3516	0,04450	0,06947	1,3798	0,04171	$0,28 \times 10^{-2}$
0,02	0,08858	1,7340	0,01845	0,09047	1,7668	0,01711	$0,13 \times 10^{-2}$
0,01	0,10558	2,0265	0,00941	0,10763	2,0620	0,00867	$0,74 \times 10^{-3}$
0,005	0,12094	2,3205	0,00478	0,12342	2,3635	0,00438	$0,40 \times 10^{-3}$
0,002	0,14071	2,7118	0,00194	0,14439	2,7756	0,00168	$0,26 \times 10^{-3}$
0,001	0,15730	3,0094	0,00098	0,15813	3,0238	0,00095	$0,32 \times 10^{-4}$

Schon diese Zusammenstellung unkorrigierter Werte bestätigt den Befund von Manabe und Matula, daß der Chlorionengehalt einer Kaliumchloridlösung bei Anwesenheit von Eiweiß eine Verminderung erfährt. Die tatsächliche Bindung ist aber noch größer als in Tabelle II, und zwar, wie oben auseinandergesetzt wurde, ist sie für alle Kaliumchloridkonzentrationen um den Betrag $3,26 \times 10^{-4}$ höher. Wird diese Korrektur in der Tabelle II angebracht, dann tritt noch deutlicher hervor, daß die Chloraufnahme bei den niedrigsten zugesetzten Salzkonzentrationen relativ am größten ist. Darüber belehrt die Tabelle III.

Tabelle III.

Serum 1,14 % und KCl. Korrektur $3,26 \times 10^{-4}$.

Anfangskonzentration C_{Cl}	Gleichgewichtskonzentration C_{Cl}	Gebundenes Chlor		
		C_{Cl}	P_{Cl}	% der Anfangskonzentration
0,08642	0,08196	0,00446	2,351	5,16
0,04483	0,04171	0,00312	2,506	7,12
0,01878	0,01711	0,00167	2,777	8,89
0,00974	0,00867	0,00107	2,971	10,99
0,00511	0,00438	0,00073	3,137	14,29
0,00227	0,00168	0,00059	3,229	25,99
0,00130	0,00095	0,00035	3,456	26,92

Der Verfolgung einer Chloraufnahme bei noch niedrigeren Chloridzusätzen wird durch den ursprünglichen Chlorionenwert einer reinen Serum-Kalomelmischung ($4,31 \times 10^{-4}$) eine Grenze gesteckt. Dagegen ist eine solche Verfolgung in niedrigere Werte, wie sich zeigte, bei Anwesenheit von kleinen Säure-

mengen möglich, welcher Zusatz eine Zurückdrängung der Konzentration von freien Chlorionen im System Eiweiß-Kalomel zufolge hat. Über diese Wasserstoffionenwirkung wird noch unten Näheres angegeben, hier seien nur einige Daten angeführt, um die relativ gewaltige Bindung von Chlorionen bei niedrigsten Chlorionenkonzentrationen unter diesen Verhältnissen darzulegen (Tabelle IV).

Tabelle IV.

	E.M.K.	C_{Cl}
Destilliertes Wasser	0,2300	$7{,}72 \times 10^{-5}$
Serum mit H_2SO_4 0,008 n, ohne KCl . . .	0,2692	$1{,}61 \times 10^{-5}$
Gebundene Chlorionen	n	$6{,}11 \times 10^{-5}$
	in %	77,34

Wir sehen, daß die Chlorionenkonzentration im Serumversuch bei Säureanwesenheit ohne Kaliumchloridzusatz schon ganz nahe dem Werte liegt, den F. Kohlrausch[1]) für die Kalomellöslichkeit zu $1{,}0 \times 10^{-5}$ gefunden hat, und der Chlorverbrauch macht hier fast $^4/_5$ der anfänglichen Chlorionenkonzentration aus.

Im folgenden Diagramm (Fig. 1) stellt die absteigende Kurve (II) den Zusammenhang dar zwischen den gebundenen Chlormengen als Ordinate (in Prozenten) und der anfänglichen Chlorionenkonzentration. Die Chlorionenanfangskonzentration in Mol/Liter dient als Abszisse. Die aufsteigende Kurve (I) da-

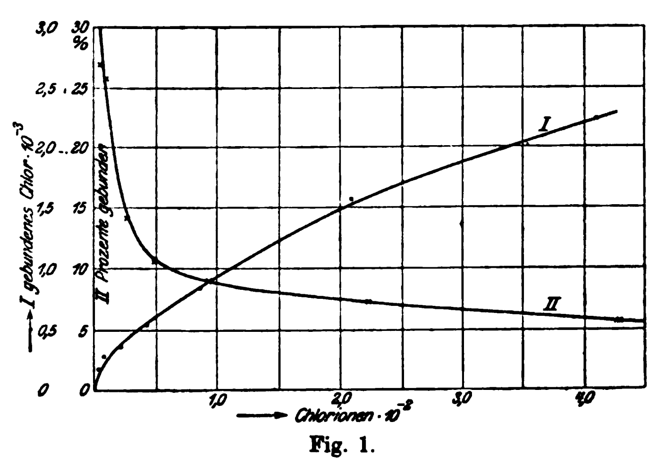


Fig. 1.

[1]) Zeitschr. f. physik. Chemie 64, 129, 1908 und 50, 355, 1904.

gegen orientiert über die Beziehung zwischen den gebundenen Chlormengen (Ordinate Mol/Liter) und den Gleichgewichtskonzentrationen von Chlorionen (Abszisse Mol/Liter). Die Ordinateneinheit ist 10 mal größer als die Abszisseneinheit.

Werden, wie es bei Adsorptionsversuchen üblich, als Abszissen die Logarithmen der Gleichgewichtskonzentrationen, als Ordinaten die Logarithmen der aufgenommenen Chlormengen, also die beiden Chlorionenexponenten aufgetragen, so erhält man nahezu eine Gerade, wenigstens für die sicheren Werte bei höheren Kaliumchloridkonzentrationen (Fig. 2).

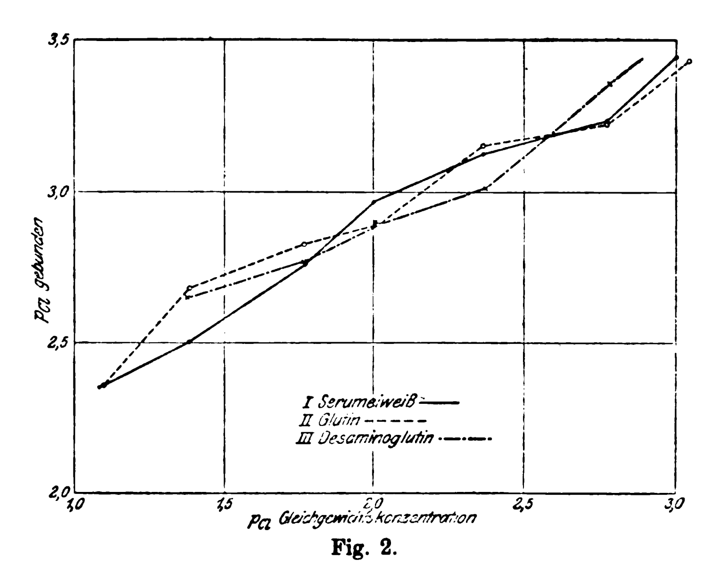


Fig. 2.

Tabelle V enthält eine Zusammenstellung von Versuchen bei wechselndem Serumgehalt. Die geringen Kaliumchloridzusätze, bei denen die Chloraufnahme relativ am größten ist, können zu diesen Versuchen nicht herangezogen werden, weil bei diesen Konzentrationen der Einfluß der chemischen Reaktion zwischen Eiweiß und Kalomel sehr ausgiebig ist und die entsprechenden Korrekturen in Anbetracht der wechselnden Mengen von Eiweiß wenig sicher sind. Die hohen Kaliumchloridkonzentrationen, in denen die absolute Abnahme des Chlorionengehaltes größer ist, sind gleichfalls zu solchen Messungen wenig geeignet, weil hier einer relativ starken Abnahme von Chlorionen eine verhältnismäßig kleine Änderung der elektromotori-

schen Kraft entspricht. Deshalb wurde der Konzentrationseinfluß von Eiweiß auf die Chloraufnahme bei dem mittleren anfänglichen Kaliumchloridgehalt von 0,02 n verfolgt.

Tabelle V.

Wechselnde Serumkonzentrationen. KCl — 0,02 n.

Serum (Eiweißgehalt) °/₀	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	Gebundenes Chlor	Gebundenes Chlor (korrigierte Werte)
0	0,08858	1,7340	0,01845	—	—
0,127	0,08984	1,7558	0,01755	$0{,}90 \times 10^{-3}$	$0{,}94 \times 10^{-3}$
0,254	0,08986	1,7562	0,01753	$0{,}92 \times 10^{-3}$	$0{,}99 \times 10^{-3}$
0,635	0,09016	1,7614	0,01732	$1{,}13 \times 10^{-3}$	$1{,}31 \times 10^{-3}$
1,143	0,09047	1,7668	0,01711	$1{,}34 \times 10^{-3}$	$1{,}67 \times 10^{-3}$

Aus der Tabelle V erhellt, daß die Bindung von Chlorionen viel langsamer zunimmt als die Eiweißkonzentration. Eine quantitative Verwertung der Messungen erscheint schon deswegen wenig versprechend, weil der größte Unterschied in den elektromotorischen Kräften einerseits beim Gehalte Null, anderseits bei der maximalsten verfügbaren Eiweißkonzentration nicht mehr als 2 MV. beträgt. Der Sinn der Resultate: Ansteigen der Chloraufnahme mit wachsendem Eiweißgehalt und die relativ langsamere Zunahme der ersteren, ist ausnahmslos nachzuweisen. Die Korrekturwerte wurden unter der Annahme angebracht, daß die Umsetzung zwischen Eiweiß und Kalomel proportional der Menge des ersteren erfolgt. Einer Eiweißkonzentration von 1,14°/₀ entspricht aus früheren Versuchen die Korrektur $+ 3{,}26 \times 10^{-4}$, daraus ergeben sich die Zwischenwerte.

S ä u r e z u s a t z (H_2SO_4) bewirkt eine größere Chloraufnahme. Diese Zunahme ist erst bei den niedrigen Chlorionenkonzentrationen deutlich (Tabelle VI).

Tabelle VI.

Serum 1,02°/₀ (und H_2SO_4).

Serumversuche ohne H_2SO_4		H_2SO_4 n	Nullversuche ohne Serum		Serumversuche mit H_2SO_4		Mehrbindung in Anwesenheit von H_2SO_4
E.M.K.	C_{Cl}		E.M.K.	C_{Cl}	E.M.K.	C_{Cl}	
0,1074	$1{,}03 \times 10^{-2}$	0,04	0,1056	$1{,}10 \times 10^{-2}$	0,1090	$0{,}96 \times 10^{-2}$	$7{,}00 \times 10^{-4}$
0,1551	$1{,}53 \times 10^{-3}$	0,008	—	(ca. $1{,}40 \times 10^{-3}$)	0,1624	$1{,}15 \times 10^{-3}$	$3{,}80 \times 10^{-4}$
0,1861	$4{,}45 \times 10^{-4}$	0,008	0,2073	$1{,}91 \times 10^{-4}$	0,2154	$1{,}39 \times 10^{-4}$	$3{,}06 \times 10^{-4}$
0,1949	$3{,}14 \times 10^{-4}$	0,008	0,2300	$7{,}72 \times 10^{-5}$	0,2692	$1{,}61 \times 10^{-5}$	$2{,}98 \times 10^{-4}$

Es ist von den Adsorptionsuntersuchungen her bekannt, daß ein Wasserstoffionenzusatz die Bindung von Salzanion und Hydroxylionenzusatz von Salzkation an das Adsorbens befördert. Beim Protein kommen auf Grund bisheriger Erfahrungen für die erwähnte Wirkung von Säurezusatz auf die Chlorionen verschiedene Möglichkeiten in Betracht. In erster Linie dürfte wohl die Einwirkung von Säure als eine Zurückdrängung der Reaktion vom Eiweiß mit Kalomel aufzufassen sein. Diese Annahme findet eine wichtige Stütze in Versuchen von Pauli und L. Flecker (l. c.), in welchen bei niederen Schwermetallsalzkonzentrationen ein Säurezusatz eine stark hemmende Wirkung auf die Schwermetallausflockung ausübte. Der Eintritt des Wasserstoffions in das Eiweißmolekül hemmt die Reaktion mit dem Schwermetallion. Als weitere Möglichkeit wäre noch zu erörtern, ob nicht vermehrte Chlorbindung als Ergebnis einer Reaktion von Eiweiß mit umgesetzter Salzsäure auftritt. Daß dies nicht der Fall ist, darauf deutet der Umstand, daß die Mehrbindung auch bei Glutin vorkommt in Konzentrationen, in denen das Glutin nach Versuchen von Manabe und Matula (l. c. S. 393) praktisch kein Chlor der Salzsäure bindet.

Für die Annahme einer durch Säurezugabe bewirkten Zurückdrängung der Umsetzung von Eiweiß mit Kalomel spricht ferner auch der Einfluß eines Neutralsalzzusatzes, der sich gleichfalls in einer wohl ganz kleinen, aber doch merkbaren Erhöhung der Bindung von Chlor ausdrückt. Es ist auch hier in Übereinstimmung mit den Beobachtungen Paulis und Fleckers über die Neutralsalzschutzwirkung (l. c.), eine Hemmung der Reaktion Eiweiß mit Kalomel anzunehmen gestattet.

Aus der Zusammenstellung in der Tabelle VI folgt, daß im Falle einer Kaliumchloridkonzentration von 0,01 n keine deutlich größere Chloraufnahme in Anwesenheit von 0,04 n-Schwefelsäure stattfindet, als ohne die letztere. Die relative Zunahme der Chlorbindung ist schon beträchtlich bei 0,001 n-Kaliumchlorid und einer 50mal kleineren Schwefelsäurekonzentration. Der Unterschied wird immer größer mit abnehmendem Kaliumchloridgehalt, so daß im Falle von destilliertem Wasser nicht nur nichts von der üblichen Zunahme von Chlorionen zu erkennen ist, sondern es verschwinden schon mehr als $^3/_4$ der anfänglichen Chlorionen aus der Lösung. Natürlich läßt

sich aus diesen Versuchen nur schwer entnehmen, ob trotz der infolge Zurückdrängung der Eiweißkalomelreaktion zum Ausdruck kommenden größeren Chlorionenabnahme nicht noch irgendeine besondere Beeinflussung der Chlorionenbindung an Eiweiß durch die Säure zustande kommt. Daß eine und zwar die Cl-Bindung erhöhende spezifische Beeinflussung wahrscheinlich ist, wäre nach der letzten Kolonne (Tabelle VI) zu vermuten, die eine geringe Zunahme der Bindung bei konstantem Säuregehalt und steigendem Salzzusatz (Analoges bei Glutin s. u.) erkennen läßt.

Versuche mit Laugezugabe stießen auf Schwierigkeiten. Obwohl eine gesättigte Kalomellösung mit der Lauge weder einen Niederschlag noch auch nur eine Opalescenz von gebildetem Oxydul zeigt, wird doch das Kalomel im festen Zustande durch Lauge angegriffen und das Pulver braun gefärbt. Es könnte also an der Oberfläche von Kalomel die Hydroxylionenkonzentration infolge Adsorption so weit vergrößert werden, daß das Löslichkeitsprodukt von Quecksilberoxydul[1]), das höher liegt als jenes von Kalomel, überschritten wird. Derartige Adsorption an Krystalloberflächen wurde schon oftmals beobachtet und untersucht, vor allen von R. Marc. Eine solche Umsetzung zwischen Kalomel und Natronlauge ist von in Lösunggehen der Chlorionen ($2\,NaOH + 2\,HgCl \longrightarrow 2\,NaCl + Hg_2O + H_2O$) begleitet. Dadurch werden die entsprechenden Serumversuche stark beeinflußt. Es scheint uns trotzdem in mancher Hinsicht nicht uninteressant, die diesbezüglichen Versuche hier anzuführen.

Eine Konzentration von 0,01 n-NaOH bewirkt schon eine starke Schwärzung der Kalomelpaste und erhebliche Abnahme der elektromotorischen Kraft. So ist für eine 0,01 n-KCl die elektromotorische Kraft 0,1056 V., in Anwesenheit von 0,01 n-NaOH beträgt sie 0,0914 V., was einer 0,02 n-Kaliumchloridlösung oder dem vollständigen Umsatze Kalomel und Lauge entsprechen würde. Schon eine ganz geringe Zugabe von Natronlauge, die noch nicht hinreicht, um die Schwärzung von Kalomel hervorzurufen, bewirkt eine Erhöhung der Chlorionen-

[1]) Eine Entstehung von zweiwertigen Quecksilberionen ist ausgeschlossen, weil mit der Bildung von Mercuriionen die zugehörigen elektromotorischen Kräfte steigen und nicht, wie es beobachtet wurde, abnehmen müßten.

konzentration. Für 0,0008 n-Natronlauge zeigt z. B. die 0,01 n-Kaliumchloridlösung (0,009 41 n-Chlorionenkonzentration) eine elektromotorische Kraft von 0,1025 V., entsprechend 0,0106 n-Chlorionen.

Die Zusammenstellung in Tabelle VII zeigt, daß die Serumversuche bei Anwesenheit von Natronlauge dieselbe Chlorionenkonzentration aufweisen wie entsprechende Nullversuche ohne Serum. Daraus darf man schließen, daß die Wechselwirkung zwischen Eiweiß und Kalomel durch Lauge nicht wesentlich beeinflußt wird.

In Anwesenheit von Serum klären sich die alkalischen Kalomelflüssigkeiten viel schneller als ohne dasselbe. Ähnlich lauten Beobachtungen von Pauli und Flecker über die Ausflockung von Eiweiß durch niedere Schwermetallsalzkonzentrationen bei Alkalizugabe.

Das vollständige Wegfallen der Chlorbindung aus Alkalichlorid bei Laugenzusatz könnte bis zu einem gewissen Grade auch als Gegenstück zu der bei Säurezugabe erkennbaren Steigerung der Chloraufnahme durch Eiweiß aufgefaßt werden.

Tabelle VII.

	E.M.K.	C_{Cl}
Serum 1,12%. Kein KCl-Zusatz. NaOH ca. 0,01 n.		
Nullversuch ohne Serum . .	0,1086	$9{,}80 \times 10^{-3}$
Serumversuch	0,1088	$9{,}74 \times 10^{-3}$
Serum 1,06%. 0,0083 n-KCl. NaOH ca. 0,01 n.		
Nullversuch ohne Serum . .	0,0950	$1{,}69 \times 10^{-2}$
Serumversuch	0,0948	$1{,}70 \times 10^{-2}$

Neutralsalzzusatz ($NaNO_3$) bewirkt eine schwache Erhöhung der Chlorbindung durch Serum. Diese Erscheinung soll noch bei der Besprechung der Glutinversuche näher erörtert werden.

Versuche mit Albumin.

Da das noch so weitgehend dialysierte Serum einen wasserlöslichen Globulinrest enthält, so wurde auch das Verhalten von reinem Albumin geprüft. Zur Gewinnung desselben wurde durch Halbsättigung von Serum mit Ammoniumsulfat der Globulinanteil entfernt, das Filtrat durch Ganzsättigung ausgeflockt, der Niederschlag abgepreßt und einer 11 wöchigen Dialyse unterworfen. Die gewonnene Lösung enthielt 1,2% Albumin und erwies sich bei der Prüfung mittels Elektrodialyse so gut wie salzfrei.

Auch das so gereinigte Albumin tritt mit Kalomel unter Freiwerden von Chlorionen in Reaktion, und diese Reaktion wird durch Säure gleichfalls, wiewohl in schwächerem Grade als bei Serum (vgl. Tabelle II), gehemmt (Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

Albumin 1,2%. Kein KCl-Zusatz.

	E.M.K.	C_{Cl}	Unterschied gegen den Cl'-Gehalt eines destill. Wassers
Albumin ohne Säure . .	0,1923	$3{,}5 \times 10^{-4}$	$+2{,}7 \times 10^{-4}$ (eine Zunahme)
Albumin mit Säure (H_2SO_4 ca. 0,012 n)	0,2301	$0{,}8 \times 10^{-4}$	Ungefähr gleich

In der Tabelle IX sind die Versuche mit Kaliumchloridzusatz für dreierlei Konzentrationen zusammengestellt. Die Ergebnisse weichen von denen bei Serum prinzipiell nicht ab.

Tabelle IX.

Albumin 1,0% und KCl.

KCl	Nullversuche			Albuminversuche			Gebundenes Chlor n	
n	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	ohne Korrektur	mit Korrektur
0,01	0,10467	2,0265	0,00941	0,10523	2,0362	0,00920	$0{,}2 \times 10^{-3}$	$0{,}4 \times 10^{-3}$
0,02	0,08925	1,7340	0,01845	0,09026	1,7515	0,01772	$0{,}7 \times 10^{-3}$	$0{,}9 \times 10^{-3}$
0,05	0,06780	1,3516	0,04450	0,06925	1,3767	0,04201	$2{,}5 \times 10^{-3}$	$2{,}7 \times 10^{-3}$

Als Korrektur ist der Wert $2{,}2 \times 10^{-4}$ nach Tabelle VIII berechnet.

Aus dieser Versuchsreihe folgt, daß auch Albumin das Chlor bindet, jedoch, soweit es die wenigen Versuche zu übersehen gestatten, in etwas schwächerem Grade als das Serum.

Versuche mit Glutin.

Die gesonderte Stellung, die das Glutin unter den übrigen Proteinstoffen infolge seiner Armut an endständigen Aminogruppen einnimmt, ließ eine spezielle Untersuchung dieses Körpers von Interesse erscheinen, insbesondere da die Beobachtungen von W. Bayliss[1]), daß sich ein Salz nie vollständig aus Gelatine entfernen läßt, von diesem Autor als Ausdruck eines starken Salzbindungsvermögens des Glutins in niedrigen Salzkonzentationen verwertet worden sind.

Als Versuchsmaterial diente eine 3 Wochen hindurch dialysierte Gelatine, von der eine 2,15%ige Lösung hergestellt wurde. Da die Lösungen bei Zimmertemperatur gewöhnlich

[1]) Biochem. Journ. 1, 175, 1906.

erstarrt und trübe sind, so wurden sie vor Einfüllung in die Elektrode durch gelindes Erwärmen verflüssigt. Nachdem die Flüssigkeit die Zimmertemperatur angenommen hatte, wurden die Messungen vorgenommen.

So wie die früher untersuchten Eiweißkörper reagierte auch Gelatine mit Kalomel unter Freiwerden von Chlorionen. Darüber gibt Tabelle X Auskunft, in der 3 Versuche ohne Kaliumchloridzusatz zusammengefaßt sind.

Tabelle X.

2,15% Gelatine ohne KCl-Zusatz.

E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	Chlorionengehalt im destill. Wasser
0,1888	3,399	$3,99 \times 10^{-4}$	$4,6 \times 10^{-5}$
0,1866	3,361	$4,36 \times 10^{-4}$	
0,1876	3,385	$4,13 \times 10^{-4}$	
	Mittelwert	$4,16 \times 10^{-4}$	

Die Zunahme der Chlorionen eines Gelatine-Kalomelgemisches ist also, im Vergleich mit dem Chlorionengehalt bei Anwendung destillierten Wassers, gleich $3,7 \times 10^{-4}$.

Ein Säurezusatz hemmt diese Reaktion zwischen Glutin und Kalomel (Tabelle XI).

Tabelle XI.

1,72% Gelatine ohne KCl-Zusatz mit Säure.

	E.M.K.	C_{Cl}	Unterschiede im Chlorionengehalt gegen das Wasser
Gelatine ohne Säure . .	0,1988	$2,72 \times 10^{-4}$	Zunahme $1,98 \times 10^{-4}$
Gelatine mit 0,01 n-H_2SO_4	0,2351	$0,63 \times 10^{-4}$	Abnahme $0,11 \times 10^{-4}$
Nullversuch ohne Gelatine (destill. Wasser) . . .	0,2311	$0,74 \times 10^{-4}$	—

In Tabelle XII sind Versuche bei wechselnden Kaliumchloridkonzentrationen wiedergegeben.

Tabelle XII.

Gelatine 1,94% und KCl.

KCl n	Nullversuche			Glutinversuche			Gebundenes Chlor n
	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	
0,1	0,05109	1,0651	0,08609	0,05231	1,0862	0,0820	$0,41 \times 10^{-2}$
0,05	0,06791	1,3516	0,04450	0,06975	1,3839	0,0414	$0,31 \times 10^{-2}$
0,02	0,08860	1,7340	0,01845	0,09022	1,7621	0,0173	$0,11 \times 10^{-2}$
0,01	0,1040	2,0265	0,00941	0,1070	2,0784	0,00837	$0,10 \times 10^{-2}$
0,005	0,1191	2,3205	0,00478	0,1214	2,3604	0,00436	$0,42 \times 10^{-3}$
0,002	0,1399	2,7118	0,00194	0,1431	2,7673	0,00171	$0,23 \times 10^{-3}$
0,001	0,1553	3,0094	0,00098	0,1573	3,0441	0,00094	$0,40 \times 10^{-4}$

Um die Ergebnisse mit den früheren von Serum zu vergleichen, muß man die Korrektur für die Kalomelbindung einführen. Diese macht für 1,94 % Gelatine $3,3 \times 10^{-4}$ aus. Wie sich die Resultate dann gestalten, darüber belehrt uns Tabelle XIII.

Tabelle XIII.

1,94 % Gelatine und KCl. Korrektur $3,3 \times 10^{-4}$.

Anfangskonzentration C_{Cl}	Gleichgewicht konz. C_{Cl}	Gebundenes Chlor		
		n	P_{Cl}	% der Anfangskonzentration
0,0864	0,0820	$4,4 \times 10^{-3}$	2,357	5,09
0,0448	0,0414	$3,4 \times 10^{-3}$	2,685	7,59
0,0188	0,0173	$1,5 \times 10^{-3}$	2,824	7,98
0,0097	0,0084	$1,3 \times 10^{-3}$	2,886	13,40
0,0051	0,0044	$0,7 \times 10^{-3}$	3,155	13,70
0,0023	0,0017	$0,6 \times 10^{-3}$	3,222	26,10
0,00131	0,00094	$0,87 \times 10^{-3}$	3,432	28,32

Die Abhängigkeit der Chloraufnahme von der Chlorionenkonzentration ist also bei Glutin prinzipiell nicht verschieden von der bei Serum; auch quantitativ zeigen sich nur ganz kleine Abweichungen, die ihre Ursache in den Schwankungen der einzelnen Ablesungen haben können, welche bei der kleinen Zahl von Messungen mehr zur Geltung kommen. Ein gutes Bild der Abhängigkeit des gebundenen Chlors von der Gleichgewichtskonzentration der Chlorionen gibt die graphische Darstellung der Versuche in Fig. 2 (logarithmische Werte). Wenn man von den Schwankungen absieht, die in der Methode selbst liegen, und deren Einfluß erst durch viele Versuche eliminiert werden könnte, so nähert sich auch hier die Kurve (II) einer Geraden.

Über die Abhängigkeit der Chlorbindung von der Gelatinekonzentration orientiert die Zusammenstellung in der Tabelle XIV. Es wechselt hier die Gelatinekonzentration, wie 1 : 5 : 9, während die Kaliumchloridkonzentration 0,01 n beträgt.

Tabelle XIV.

Wechselnde Glutinkonzentration. 0,01 n-KCl.

Glutingehalt	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	Gebundenes Chlor	
				ohne Korrektur	mit Korrektur
0	0,1040	2,0265	0,00941	—	—
0,215 %	0,1044	2,0334	0,00926	$1,5 \times 10^{-4}$	$1,9 \times 10^{-4}$
1,075 %	0,1048	2,0404	0,00911	$3,0 \times 10^{-4}$	$4,8 \times 10^{-4}$
1,935 %	0,1064	2,0681	0,00855	$8,6 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-3}$

Die gebundene Menge Chlor wächst, wie die Tabelle zeigt, auf das 5fache, wenn die Glutinkonzentration den 9fachen Wert erreicht. Trotz einer gewissen Unsicherheit der Werte, bieten dieselben dennoch über den Verlauf der Erscheinungen eine sichere Orientierung. Es besteht auch hier keine einfache Proportionalität zwischen gebundenen Chlor- und den Eiweißmengen — die ersteren nehmen langsamer zu bei Wachsen der letzteren.

Wie schon bei den Serumversuchen angedeutet wurde, ruft Zusatz eines verschiedenionigen Neutralsalzes eine schwache, aber sicher reproduzierbare Erhöhung der Bindung von Chlor durch Eiweiß hervor.

Die diesbezüglichen Beobachtungen sind in Tabelle XV zusammengefaßt. Diese Erscheinung bedarf noch einer Klärung durch weitere Versuche[1]).

Tabelle XV.

1,72 % Glutin. KCl. $NaNO_3$.

KCl-Zusatz n	$NaNO_3$ n	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	Gebundenes Chlor
0,01	0	0,1063	2,0664	$8,58 \times 10^{-3}$	$0,83 \times 10^{-3}$
0,01	0,01	0,1091	2,1149	$7,68 \times 10^{-3}$	$1,73 \times 10^{-3}$
0,01	0,10	0,1114	2,1548	$7,00 \times 10^{-3}$	$2,41 \times 10^{-3}$
0,01 ohne Gelatine (Nullv.)	—	0,1040	2,0265	$9,41 \times 10^{-3}$	—
0,001	0	0,1596	3,0839	$8,20 \times 10^{-4}$	$1,60 \times 10^{-4}$
0,001	0,01	0,1604	3,0978	$8,00 \times 10^{-4}$	$1,80 \times 10^{-4}$
0,001	0,10	0,1656	3,1879	$6,50 \times 10^{-4}$	$3,30 \times 10^{-4}$
0,001 ohne Gelatine (Nullv.)	—	0,1553	3,0094	$9,80 \times 10^{-4}$	—
Kein KCl-Zusatz	0	0,1907	3,4315	$3,70 \times 10^{-4}$	$-2,96 \times 10^{-4}$
" "	0,01	0,1920	3,4541	$3,50 \times 10^{-4}$	$-2,76 \times 10^{-4}$
"	0,10	0,1985	3,5915	$2,60 \times 10^{-4}$	$-1,86 \times 10^{-4}$
Destilliertes Wasser ohne Gelatine (Nullv.)		0,2311	4,1308	$0,74 \times 10^{-4}$	—

Es wurde schon oben über die Einwirkung eines Schwefelsäurezusatzes auf den Chlorionengehalt einer Gelatine-Kalomelmischung berichtet (Tabelle XI). Auch bei höheren Kaliumchloridkonzentrationen wirkt ein Zusatz von Schwefelsäure im Sinne einer Abnahme der freien Chlorionen. Ähnlich wie bei Serum ist der Einfluß von Säurezusatz schon bei 0,01 n-Kaliumchlorid merklich und wird bei niedrigerer Kaliumchloridkonzentration bedeutend. In der Tabelle XVI sind Versuche bei 0,001 n-Kaliumchlorid zusammengestellt.

[1]) Diese Erfahrung steht anscheinend im Zusammenhang mit den Beobachtungen von Pauli und Flecker (l. c. S. 488) über die Schutzwirkung von Neutralsalz.

Tabelle XVI.

1,72 % Gelatine. 0,001 n-KCl.

H_2SO_4 n	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	Gebundenes Chlor
0	0,1579	3,0545	$8,8 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$
0,01	0,1669	3,2104	$6,2 \times 10^{-4}$	$3,6 \times 10^{-4}$
Nullversuch ohne Gelatine	0,1553	3,0094	$9,8 \times 10^{-4}$	—

Die durch Anwesenheit von 0,01 n-Schwefelsäure hervorgerufene Mehrbindung von Chlor in Anwesenheit einer 0,001 n-Kaliumchloridlösung betrug $2,6 \times 10^{-4}$. Die in Tabelle XI dargestellte, durch ebenso starken Säurezusatz bewirkte Erhöhung der Chlorbindung ans Glutin ohne Kaliumchloridzusatz betrug $2,09 \times 10^{-4}$. Auch hier nimmt also, wie bei Serumeiweiß, die Mehrbindung mit steigendem Chlorionengehalt zunächst zu.

Versuche mit Desaminoglutin.

Zur Prüfung der Frage, wie weit die Anlagerung von gebundenen Neutralsalzen unter Mitwirkung der endständigen Aminogruppen des Eiweißkomplexes erfolgt, konnten Untersuchungen an einem seiner endständigen Aminogruppen beraubten Eiweißkörper ausgeführt werden. Als solcher diente das gut wasserlösliche Desaminoglutin. Über die Darstellung dieses Körpers nach Zd. Skraup ist in der Publikation von L. Blasel und J. Matula[1]) eingehend berichtet. Unser Material war 14 Tage hindurch dialysiert und sein Gehalt an Trockensubstanz 1,5 %. Dieser Körper ist dank seiner relativ hohen Leitfähigkeit für elektrometrische Untersuchungen recht geeignet.

Ähnlich den früher von uns untersuchten Eiweißkörpern, gibt Desaminoglutin, mit Kalomelpaste zusammengebracht, einen höheren Chlorionengehalt als destilliertes Wasser, doch ist diese Erhöhung schwächer als bei den anderen Eiweißkörpern. Durch einen Säurezusatz wird die Erhöhung von Chlorionengehalt gleichfalls zurückgedrängt (Tabelle XVII).

Tabelle XVII.

1,5 % Desaminoglutin ohne KCl-Zusatz.

H_2SO_4 n	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}
0	0,1699	3,591	$2,57 \times 10^{-4}$
ca. 0,01	0,2161	3,872	$1,34 \times 10^{-4}$

Der zugehörige Gehalt an Chlorionen im Wasser war ca. $0,7 \times 10^{-4}$

[1]) Diese Zeitschr. 58, 417, 1914.

In Tabelle XVIII sind die Versuche mit Kaliumchloridzusatz zusammengefaßt.

Tabelle XVIII.
1,2 % Desaminoglutin und KCl.

KCl	Nullversuche			Desaminoglutinversuche			Gebundenes Chlor
n	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	n
0,05	0,06780	1,3516	0,04450	0,06901	1,3726	0,04241	$0{,}21 \times 10^{-2}$
0,02	0,08925	1,7340	0,01845	0,09148	1,7726	0,01692	$0{,}15 \times 10^{-2}$
0,01	0,10467	2,0265	0,00941	0,10866	2,0956	0,00825	$1{,}16 \times 10^{-3}$
0,005	0,12022	2,3205	0,00478	0,12375	2,3817	0,00415	$0{,}63 \times 10^{-3}$
0,002	0,13984	2,7118	0,00194	0,14470	2,7787	0,00166	$0{,}28 \times 10^{-3}$

Die gebundenen Mengen von Chlor sind nicht nur in ihrer Abhängigkeit von der Kaliumchloridkonzentration (die Chlorbindung ist bei niedrigen Chlorionenkonzentrationen relativ höher), sondern auch ihren Größen nach ganz nahe denjenigen bei Serum (Tabelle II). Die aus kleineren Kaliumchloridkonzentrationen gebundenen Chlormengen sind in Tabelle XVIII etwas größer als die entsprechenden Serumwerte in Tabelle II. Das stimmt recht gut mit dem kleineren Ausmaße der Reaktion von Desaminoglutin mit Kalomel (Tabelle XVII) verglichen mit Serum (Tabelle I).

Die aus Tabelle XVII folgende Korrektur für 1,5 % Desaminoglutin beträgt ca. $1{,}9 \times 10^{-4}$, für 1,2 % Desaminoglutin würde sich $1{,}5 \times 10^{-4}$ ergeben.

Die danach umgerechneten Ergebnisse der Tabelle XVIII sind in der Tabelle XIX vereinigt.

Tabelle XIX.
1,2 % Desaminoglutin und KCl. Korrektur $1{,}5 \times 10^{-4}$.

Anfangskonzentration C_{Cl}	Gleichgewichtskonzentration C_{Cl}	Gebundenes Chlor		
		n	P_{Cl}	% der Anfangskonzentration
0,04465	0,04241	$2{,}24 \times 10^{-3}$	2,650	5,02
0,01860	0,01692	$1{,}68 \times 10^{-3}$	2,775	9,03
0,00956	0,00825	$1{,}31 \times 10^{-3}$	2,883	13,70
0,00493	0,00415	$0{,}78 \times 10^{-3}$	3,108	15,82
0,00209	0,00166	$0{,}43 \times 10^{-3}$	3,367	20,58

Die logarithmischen Werte dieser Versuchsreihe sind graphisch in der Fig. 2 dargestellt. Die entsprechenden Punkte (×) liegen auch bei Desaminoglutin beinahe auf einer Geraden. Mit Rücksicht auf den kleineren Gehalt an Trockensubstanz bindet Desaminoglutin, trotz des Fehlens der endständigen Aminogruppen, das Chlor besser als das reine Glutin.

Versuche mit einfachen Aminosäuren und Harnstoff.

Um ein gewisses Verständnis des konstitutiven Charakters der Chloraufnahme durch Eiweißkörper zu gewinnen, wurden in dieser Richtung auch einfache Aminosäuren geprüft. Zur Untersuchung gelangte Glykokoll (Aminoessigsäure) und Alanin (α-Aminopropionsäure).

Eine Glykokollösung von 2 % reagiert mit Kalomel nicht. Sie zeigt, in eine Kalomelelektrode gebracht, am Anfange dieselbe elektromotorische Kraft wie das zur Lösung benutzte destillierte Wasser. Nach längerer Zeit dagegen differieren diese Werte, indem die Glykokollösung die bei Wasser beobachtete zeitliche Zunahme der elektromotorischen Kraft nicht erkennen läßt. Dieses wiederholt sichergestellte Verhalten veranschaulicht die nächste Tabelle XX.

Tabelle XX.

Zeit	E.M.K.	
	2 % Glykokoll	Dest. Wasser
erste Messung	0,2044 V.	0,2060 V.
4 St.	0,2056 „	—
6 „	0,2050 „	—
24 „	0,2026 „	0,2185 V.

Der Umstand, daß Glykokoll nicht merklich mit Kalomel reagiert, ist für unsere Messungen besonders glücklich, indem er erlaubt, die Versuchsergebnisse ohne irgendwelche immerhin mit einer gewissen Unsicherheit behaftete Korrekturen leicht zu übersehen.

Bemerkenswert ist demgegenüber die deutliche Bindung von Chlor durch Glykokoll aus Kaliumchloridlösungen. Die Resultate der diesbezüglichen Versuche sind in Tabelle XXI enthalten.

Tabelle XXI.
1,6 % Glykokoll und KCl.

KCl n	Nullversuche			Glykokollversuche			Gebundenes Chlor		
	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	C_{Cl}	P_{Cl}	Prozente
0,05	0,06872	1,3516	0,04450	0,06932	1,3620	0,04346	$1,04 \times 10^{-3}$	2,983	2,36
0,02	0,08905	1,7340	0,01845	0,09027	1,7550	0,01760	$0,85 \times 10^{-3}$	3,071	4,61
0,01	0,10460	2,0265	0,00941	0,10621	2,0544	0,00882	$0,59 \times 10^{-3}$	3,229	6,27
0,005	0,11880	2,3205	0,00478	0,12244	2,3836	0,00413	$0,65 \times 10^{-3}$	3,187	13,60
0,002	0,13984	2,7118	0,00194	0,14613	2,8208	0,00151	$0,43 \times 10^{-3}$	3,367	22,17
0,001	0,15785	3,0094	0,00098	0,16575	3,1463	0,00071	$0,27 \times 10^{-3}$	3,569	27,55

Die Ergebnisse sind in der Fig. 3 graphisch dargestellt. Kurve I stellt den Zusammenhang der gebundenen Chlormengen mit den Gleichgewichtskonzentrationen der Chlorionen dar.

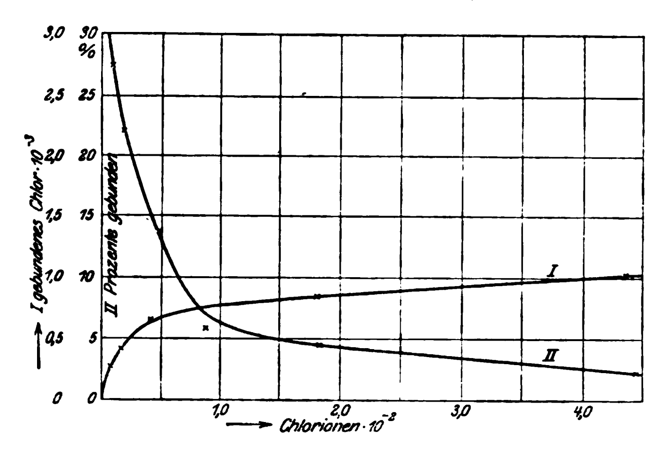


Fig. 3.

Die Kurve hat das für Adsorptionsprozesse typische Aussehen. Werden die logarithmischen Werte zur graphischen Darstellung benutzt, so wird die Kurve zwar nicht genau eine Gerade, allein die Abweichungen liegen ziemlich in den Fehlergrenzen der Methode, die namentlich bei höheren Chlorionenkonzentrationen schon bedeutende prozentuelle Differenzen in den gebundenen Chlorionenmengen verursachen. Dieser Verlauf der Chlorbindung gemäß einer „Adsorptionsabhängigkeit" bildet einen der wahrscheinlich häufigeren aber bisher wenig bekannten Fälle von Geltung der formalen Adsorptionsbeziehung in einem homogenen System. Von „Adsorption" in einem homogenen System zu sprechen hat keinen physikalischen Sinn mehr, für die Theorie der Adsorption als Übergang zu chemischen Verbindungen im engeren Sinne bietet dagegen ein solcher Fall viel Interesse (s. u.).

Die Kurve II (Fig. 3) gibt die prozentuelle Abhängigkeit des gebundenen Anteils von der Anfangskonzentration wieder. Man sieht, daß bei niederen Konzentrationen immer relativ mehr Chlor gebunden wird, was auch für Adsorptionsprozesse an festen Oberflächen typisch ist.

Die Kurve I zeigt ferner, wie die gebundenen Chlormengen sich bei konstantem Glykokollgehalt einem maximalen Werte nähern. Dieser Wert scheint gegen $1{,}5 \times 10^{-3}$ zu liegen. Da eine 1,6 %ige Glykokollösung ungefähr 0,2 molar ist, so bedeutet dies, daß 1 Mol Glykokoll nur $7{,}5 \times 10^{-3}$ Mol Chlors unionisiert zu binden im-

stande ist, also mehr als 100mal weniger als den stöchiometrischen Verhältnissen entsprechend. Eine Verbindung Glykokoll-Alkalisalz wäre also nahezu vollständig dissoziiert.

Eine ähnliche Betrachtung für Serum (aus Fig. 1 Kurve 1) ergibt als maximalen Wert der Chlorbindung durch ein 1,14 $^0/_0$ Serum ca. 6×10^{-8}. Das heißt, daß 11,4 g Serum 6×10^{-8} Mol Chlor aus Alkalisalz unionisiert bindet.

Wir möchten es vermeiden, bei der Kompliziertheit der Bindungsverhältnisse einer Polyaminosäure und dem unbekannten Molekulargewicht von Eiweiß hier weitere Betrachtungen anzuknüpfen.

Das nächstliegende Homologe, die α-Aminopropionsäure (Alanin), ist ein weniger günstiges Material für unsere Untersuchungen, indem sie deutlich mit Kalomel reagiert, wobei neue Chlorionen in der Flüssigkeit entstehen. In der Tabelle XXII sind zwei Versuche wiedergegeben, die dieses Verhalten klar hervortreten lassen. Zu diesen Versuchen wurde eine 2,3 $^0/_0$ ige Alaninlösung, der verwendeten Glykokollösung äquimolekular, benutzt.

Tabelle XXII.

2,3 $^0/_0$ Alanin ohne KCl.

E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}
0,1725	3,116	$7,65 \times 10^{-4}$
0,1753	3,165	$6,85 \times 10^{-4}$
	Mittel	$7,25 \times 10^{-4}$
Ein destilliertes Wasser zu gleicher Zeit		$0,7 \times 10^{-4}$

In unserer Alaninlösung werden (nach Abzug der in Wasser allein bestehenden) $6,5 \times 10^{-4}$ Chlorionen in Freiheit gesetzt. Dieser Umstand läßt bei Versetzen der Alaninlösung mit Kaliumchlorid eine geringe oder gar keine Abnahme der freien Chlorionen erwarten.

In der Tabelle XXIII sind die diesbezüglichen Versuche zusammengestellt. Alanin ist hier 1,9 $^0/_0$ entsprechend den zugehörigen Glykokollösungen.

Als Korrektur ist in der obigen Tabelle $\frac{6,5 \times 1,9}{2,3} \times 10^{-4} = 5,1 \times 10^{-4}$ eingesetzt. Die mit Berücksichtigung dieser Korrektur gefundenen Werte sind ihrer Größenordnung nach von denen für äquimolekulare Glykokollösungen nicht verschieden.

Tabelle XXIII.

1,9% Alanin und KCl.

KCl	Nullversuche			Alaninversuche			Gebundenes Chlor	
n	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	E.M.K.	P_{Cl}	C_{Cl}	ohne Korrektur	mit Korrektur
0,05	0,06773	1,3516	0,04450	0,06793	1,3551	0,04415	$+0{,}35 \times 10^{-3}$	$+0{,}86 \times 10^{-3}$
0,01	0,10372	2,0265	0,00941	0,10413	2,0336	0,00926	$+0{,}15 \times 10^{-3}$	$+0{,}66 \times 10^{-3}$
0,005	0,11827	2,3205	0,00478	0,11969	2,3451	0,00452	$+0{,}26 \times 10^{-3}$	$+0{,}77 \times 10^{-3}$
0,002	0,14132	2,7118	0,00194	0,14011	2,6908	0,00204	$-0{,}10 \times 10^{-3}$	$+0{,}41 \times 10^{-3}$

Harnstofflösungen weisen dagegen keine Reaktion mit Kalomel auf. Interessant ist, daß eine Harnstofflösung analoge zeitliche Potentialänderungen in der Elektrode bewirkt wie destilliertes Wasser (Tabelle XXIV).

Tabelle XXIV.

Zeit	1,2%ige Harnstofflösung E.M.K.	Destilliertes Wasser E.M.K.
Erste Messung	0,2042 V.	0,2007 V.
Nach $4^1/_2$ Stunden . .	0,2082 V.	0,2082 V.
Nach 24 Stunden . .	0,2172 V.	0,2218 V.

Chlor wird durch Harnstoff nicht gebunden, wie aus den in Tabelle XXV zusammengestellten elektromotorischen Kräften für reine Kaliumchlorid- und entsprechende Kaliumchlorid-Harnstofflösungen hervorgeht.

Tabelle XXV.

0,96% Harnstoff und KCl.

KCl	E.M.K.	
n	Nullversuche	Harnstoffversuche
0,02	0,08916	0,08937
0,01	0,1039	0,1037
0,002	0,1423	0,1415

Das negative Resultat mit Harnstoff läßt die Bedeutung der Carboxylgruppe, also den amphoteren Elektrolytcharakter der Aminosäuren, für die Chloraufnahme deutlich erkennen.

Betrachtung der Versuchsergebnisse.

Unsere Versuche zeigen vor allem wiederum die große Bedeutung der elektrometrischen Methode für solche Fälle, wo, wie beim hochmolekularen Eiweiß, kleine reagierende Mengen in Betracht kommen. Neben dem auch methodisch wichtigen Nachweis einer Kalomel-Eiweißverbindung mit den typischen Merkmalen der von Wo. Pauli und L. Flecker (l. c.) näher

studierten Schwermetalleiweißkomplexe, erscheint als das Hauptergebnis unserer Versuche ein fortschreitender Einblick in die Beziehungen von Eiweiß zu Alkalisalz in der Lösung, ein Gebiet, auf dem andere als physikalisch-chemische Methoden versagen und dessen Bedeutung für biologische Fragen nicht genug geschätzt werden kann.

Unsere Erwägungen sollen sich dabei in erster Linie auf die direkt an den Eiweißkörpern beobachteten Tatsachen stützen. Feststellungen an den einfachen Aminosäuren, so wertvoll sie sind, können nur die Bedeutung einer theoretischen Erläuterung der Verhältnisse beim Eiweiß haben.

P. Pfeiffer und J. v. Modelski[1]) haben in größerem Umfange als ihre Vorgänger Verbindungen von Aminosäuren mit Neutralsalzen der Erdalkalimetalle und des Lithiums rein dargestellt und ihre Struktur als Amphisalze vom Typus Me—O.CO.R.NH_3.X, und deren Variation nach der Wertigkeit des Metalles, angenommen. In Wirklichkeit sind schon lange vorher für das Eiweiß sowohl die Formel der Amphisalzbildung (W. B. Hardy, Pauli) verwendet, als auch die Löslichkeitsbeziehungen zwischen Eiweißkörpern und Salzen (das antagonistische Verhalten gegen Salze in höheren und niederen Konzentrationen) und ihre Anwendung auf Kalksalzbindung (Pauli und Samec, l. c.), kurz alle wesentlichen allgemeinen Schlußfolgerungen der Autoren, gestützt auf ein großes Versuchsmaterial an Proteinstoffen, ausgesprochen worden. Der Umstand, daß Pfeiffer und Modelski gerade bei den für den Organismus wichtigsten Alkalisalzen bei der Darstellung von Aminosäureverbindungen negative Resultate erzielt hatten, ist für die Verhältnisse bei Eiweißkörpern, die mit Sicherheit auf das Bestehen solcher Verbindungen hinweisen, vollständig belanglos. Bei dem gegenwärtigen Stande der Frage der Adsorptionsverbindungen, deren Abgrenzung von chemischen Verbindungen im engeren Sinne nur noch bei Vorhandensein physikalischer Grenzfläche einen Zweck hat, ist die schon vor der Arbeit von Pfeiffer und Modelski herrschende Auffassung der Eiweißsalzverbindungen durch die Benutzung der gleichen Formelbilder genügend charakterisiert[2]).

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 329, 1912 und 85, 1, 1913.

[2]) In Höbers „Physikalische Chemie der Zelle und Gewebe" ent-

Über den Lösungszustand der Neutralsalzproteinverbindungen gestatten unsere Versuche im Vereine mit unseren früheren Beobachtungen einige bemerkenswerte Aussagen.

Ein Albumin, das auf 1 g Trockengewicht 10^{-4} n-Chlor aus Alkalisalz gebunden hat, zeigt bereits charakteristische Änderungen seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften. Die innere Reibung einer solchen Lösung ist erniedrigt, die Gerinnungstemperatur beträchtlich erhöht (Pauli und H. Handovsky), die Alkoholfällbarkeit stark gehemmt (Pauli und L. Brüll). Die Änderung der Koagulationstemperatur bezogen auf die Salzkonzentration gibt eine Kurve vom Charakter einer Adsorptionsisotherme, wie wir sie auch für die elektrometrisch bestimmte Chloraufnahme erhalten haben.

Bei steigendem Chloridzusatz strebt die Chlorionenbindung einem Höchstwert zu, der für 1 g Albumin bei nahe 5×10^{-4} Mole Chlor anzunehmen ist. Daraus würde sich das entschieden zu niedrige Molekulargewicht 2000 für Albumin (für Glutin 3500) berechnen. Wir dürfen deshalb annehmen, daß, ähnlich wie dies für Säure- und Laugenprotein sowie für die Eiweißverbindungen mit Schwermetallsalzen (s. o.) feststeht, sowohl die positiven als auch die negativen Neutralsalzionen an mehreren Stellen in das Proteinmolekül eintreten. Denn der Umstand, daß durch Neutralsalzzusatz eine auffällige Änderung der Eiweißladung nicht stattfindet[1]), spricht zugleich für eine nahezu gleiche Bindung von Anionen und Metallionen des Salzes. Daß für die Salzbindung an Eiweiß nicht allein endständige Aminogruppen, sondern auch binnenständiger Stickstoff (vor allem der Peptidbindung) in Betracht komme, geht unzweifelhaft aus der elektrometrisch nachgewiesenen Reaktion von Desaminoglutin mit Neutralsalz hervor. Das negative Resultat der Harnstoffversuche zeigt andererseits die Notwendigkeit der Carboxylgruppe, also des amphoteren Charakters, für die Salzbindung.

Ähnlich wie bei den Eiweißverbindungen mit Säuren,

hält noch die dritte Auflage (S. 367, Fußnote) folgende neuestens fortgelassene Bemerkung über das Eiweiß: „Pauli stellt sogar Reaktionsgleichungen für die Bildung von Verbindungen mit Alkalisalz auf“.

[1]) Wo. Pauli, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 7, 531, 1906. Vgl. auch Manabe und Matula l. c. 407.

Laugen und Schwermetallsalzen wird der Höchstwert der Bindung von Neutralsalz an Protein erst bei einem beträchtlichen Überschuß des Salzes erreicht. In niedrigeren, aber selbst das Bindungsmaximum an Gehalt übertreffenden Alkalichloridkonzentrationen werden nur mehr oder minder tief unter demselben gelegene Chlormengen an Eiweiß gebunden. Das Verhältnis des freigebliebenen „Bindungsrestes"[1]) zum Protein kann zunächst verschieden aufgefaßt werden.

Die bisher übliche Auffassung der Adsorption an Grenzflächen nimmt keine direkte Wechselwirkung zwischen freigebliebenem Bindungsrest und dem Adsorbenten an. Der in Lösung befindliche Stoffanteil wird nur mit dem adsorbierten Stoff im Gleichgewicht gedacht, eine Anschauung, die sich wohl mit der Zeit als zu enge erweisen wird.

Dagegen führt die Auffassung der Eiweiß-Neutralsalzverbindungen als komplexe Salze zu folgenden Möglichkeiten: Es kann erstens der Bindungsrest durch hydrolytische Dissoziation abgespalten sein, dann wäre das Eiweiß, soweit es nicht Salz gebunden enthält, in demselben Zustande wie ein ganz salzfreies. Bei der hydrolytischen Dissoziation würde einfach die Polyaminosäure regeneriert werden:

$$R\begin{matrix}\diagup NH_3X \\ \diagdown COOMe\end{matrix} + H_2O \longrightarrow \overset{(I)}{R\begin{matrix}\diagup NH_3OH \\ \diagdown COOH\end{matrix}} + MeX$$

wobei die hydratisierte Form I mehr oder minder in die wasserarme

$$R\begin{matrix}\diagup NH_2 \\ \diagdown COOH\end{matrix} \quad \ldots\ldots\ldots \quad (II)$$

übergehen kann.

Es kann sich aber auch zweitens um echte elektrolytische Dissoziation handeln. Diese könnte z. B. unter Bildung eines Zwitterions vor sich gehen:

$$R\begin{matrix}\diagup NH_3X \\ \diagdown COOMe\end{matrix} \longrightarrow R\begin{matrix}\diagup NH_3^+ \\ \diagdown COO^-\end{matrix} + Me^+ + X^- . \quad . \quad . \quad (III)$$

Ganz abgesehen von der zurzeit rein hypothetischen Existenz eines Atomaggregats mit zwei verschiedennamigen Ladungen, sind solche Zwitterionen in unserem Falle schwer

---

[1]) Differenz zwischen Bindungsmaximum und tatsächlich gebundenem Chlor.

anzunehmen, da sie mit den Ionen des Wassers unter Umwandlung in die wenig dissoziierten Formen I, II reagieren müßten.

Eine andere Möglichkeit der elektrolytischen Dissoziation von Eiweiß und Ampholyten überhaupt wäre dadurch gegeben, daß nicht ein und dasselbe Molekül gleichzeitig als Säure und Base reagiert, sondern in jedem Augenblick ein Teil der Moleküle als Säure, ein anderer Teil als Base ionisiert. Das Verhältnis dieser Anteile wäre durch die Relation der Affinitätskonstanten des Ampholyten bestimmt. Dann könnte bei Salzanwesenheit ein Teil der Aminosäuremoleküle mittels der Aminogruppe, ein anderer Teil mittels der Carboxylgruppe in Reaktion treten, als ob diese mit der betreffenden Säure oder Lauge des Neutralsalzes erfolgen würde. Die dabei gebildeten positiven und negativen Eiweißionen müßten sich in einer doppelsinnigen Elektrophorese des Salzproteins ausdrücken, die sich im Versuche nicht gefunden hat. Wohl aber könnten die entgegengesetzten Eiweißionen miteinander unter Neutralteilbildung reagieren. In diesem Sinne würde der Salzzusatz eine Art Polymerisierung des Eiweißes begünstigen, was mit Erfahrungen über innere Reibung und den osmotischen Druck von Salzeiweiß[1]) wohl in Einklang zu bringen wäre und auch zu Beobachtungen über Eiweißreaktionen mit Ampholyten [H. Handovsky[2])] stimmen würde.

Die Annahme von P. Pfeiffer und J. Modelski führt zur Dissoziation des Amphisalzes unter Bildung zweier komplexen Ionen von der Struktur

$$[Me.NH_2RCOOH]^+ \quad \text{und} \quad [X.NH_2RCOOH]^-.$$

Eine Folge dieser Betrachtungsweise wäre die reichliche Anwesenheit von Eiweißkationen und Eiweißanionen, für die, wie schon erwähnt, die experimentellen Belege fehlen. Ferner müßte unter allen Umständen mindestens die Hälfte des der Aminosäure äquivalenten Chloranteils in nicht ionogener Form gebunden sein. In Wirklichkeit findet sich in unseren Glykokoll- und Alaninversuchen nur gegen $1^0/_0$ der äquivalenten Chlormenge gebunden. Diese Tatsachen bergen schwere Bedenken gegen die Annahme von Pfeiffer und Modelski.

---

[1]) Pauli und Samec, noch unveröffentlicht.

[2]) Diese Zeitschr. 25, 510, 1910.

Der Verlauf der Chlorbindung aus Alkalichloriden durch einfache Aminosäuren läßt trotz der Ähnlichkeit mit der Adsorptionsisotherme kaum eine andere Deutung zu als die eines Dissoziationsgleichgewichtes. Das analoge Verhalten von Eiweiß und Neutralsalz kann im gleichen Sinne gedeutet werden. Mit dem Auftreten von Molekülaggregaten (Molaten) im Eiweiß werden sich dessen Eigenschaften ohne scharfe Grenze immer mehr denen in heterogenen Systemen nähern. Diese Molatbildung und der Aufbau als Polyaminosäure, der es mit sich bringt, daß manche Teile derselben wie „innere" Moleküle, andere wie Moleküle an einer Oberfläche mit ungesättigten Valenzen reagieren, bilden im wesentlichen die kolloidchemische Seite der Eiweißreaktionen.

Die Frage, ob die Dissoziation des Aminosäure-Neutralsalzkomplexes als hydrolytische unter Bildung der Aminosäure oder als elektrolytische verläuft, ist nicht mit voller Sicherheit zu entscheiden. Es scheint uns zumindest bei den Monoaminosäuren manches im Sinne einer überwiegenden elektrolytischen Dissoziation zu sprechen.

In Versuchen[1]) gemeinsam mit P. Dukes hat Pauli den Nachweis erbracht, daß einfache Aminosäuren, Peptone und Albumosen sich in bezug auf ihre Viscosität bei Zusatz von Elektrolyten ganz analog verhalten wie Eiweißkörper. Neutralsalz erniedrigt die innere Reibung einer Aminosäurelösung, wie dies auch von Pauli und Handovsky früher am Eiweiß gefunden worden ist. Sie wurde in beiden Fällen auf die Bildung von Salz-Eiweiß- bzw. Salz-Aminosäurekomplexen bezogen, nachdem Salz und Aminosäure für sich Reibungsanstieg bewirken und die Kombination mit Nichtelektrolyten wie Traubenzucker algebraische Summierung der Reibungseffekte der Komponenten ergibt. Die direkte elektrometrische Messung der Mischung 0,2 n-Alanin und 0,05 n-Neutralsalz zeigt, daß rund 2% des Salzanions an die Aminosäure gebunden sind, dagegen gab die Viscosität einen Abfall der Reibung um rund 20% gegenüber dem Reibungskoeffizienten der Komponenten. Da sich die Reibung der Aminosäure in diesen Konzentrationen

---

[1]) Als Inauguraldissertation im Jahre 1912 verwendet, sonst unveröffentlicht.

linear mit derselben ändert, so würde selbst ein vollständiger Wegfall von 2 % derselben nur entsprechend wenig im Reibungskoeffizienten zum Ausdruck kommen. Wir möchten deshalb die Reibungsänderung in der Aminosäure-Salzmischung nur zum geringsten Teil auf den undissoziierten Salz-Aminosäurekomplex sondern überwiegend auf die sonstige Aminosäure in der Lösung beziehen.

Würde diese einer hydrolytischen Spaltung des Salz-Aminosäurekomplexes (unverändert) entstammen, dann könnte sie sich von der Lösung einer reinen Aminosäure nicht unterscheiden und der beobachtete Reibungsunterschied bliebe unverständlich. Dagegen würde eine elektrolytische Dissoziation, wie ausgeführt, zur Bildung von neuen Ionen führen und nach Vereinigung dieser zu Komplexmolekülen die Möglichkeit einer Reibungsänderung ohne weiteres ergeben.

Die Frage, ob wir parallele Verhältnisse am Eiweiß erwarten dürfen, läßt sich wegen der komplizierteren Bindungsmöglichkeiten nicht mit voller Sicherheit entscheiden. Fest steht nur nach den Versuchen von Wo. Pauli mit H. Handovsky und L. Brüll, daß bei der elektrometrisch nachweisbaren Bindung von so geringen Salzmengen wie $5 \times 10^{-}$.n auf 1 g Eiweiß schon erhebliche, mittels Reibung, Hitze- und Alkoholkoagulierbarkeit erkennbare Zustandsänderungen des Eiweiß auftreten.

Die überaus wichtige Frage nach den Beziehungen von Neutralsalz und Eiweiß in Lösung bedarf noch von anderen Gesichtspunkten weiterer Untersuchungen, die bereits in Angriff genommen sind.

Zur Frage der Cobragiftinaktivierung des Serums.

Von

L. Hirschfeld und R. Klinger.

(Aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich.)

(Eingegangen am 25. Mai 1915.)

Das frische Serum besitzt eine Reihe von Fähigkeiten, die bei Erhitzung auf 56° verloren gehen, und die in der Regel auf besondere thermolabile Substanzen zurückgeführt wurden. Im Gegensatz zu dieser Auffassung haben wir hervorgehoben, daß die Inaktivierung des Serums die Stabilität der Serumkolloide gegen manche fällend wirkende Eingriffe erhöht und haben daher die Vermutung ausgesprochen, daß speziell die destruktive Tätigkeit, die frisches Serum auf sensibilisierte Zellen ausübt (Komplementfunktion), nicht an bestimmte, chemisch genau definierbare Substanzen, sondern an gewisse Zustände resp. Zustandsänderungen der Serumkolloide gebunden sein dürfte. Diese Ansicht schien vor allem gefestigt durch den Nachweis, daß bei einer ganzen Anzahl von komplementzerstörenden Eingriffen (Schütteln, Zusatz von Suspensionen wie Bakterien, Agar u. a., Stehen in Verdünnung mit Wasser usw.) die Lösungsverhältnisse der Serumkolloide, namentlich der Globuline, einschneidend verändert werden.

Mit der physikalisch-chemischen Erklärung der thermolabilen Serumfunktionen schienen einige Tatsachen in Widerspruch, welche die Beteiligung chemisch wohl charakterisierter Körper wahrscheinlich machen. Hierher gehört vor allem die eigenartige Zerstörung des Komplementes durch Cobragift. Da dieses Gift Lipoide (spez. Lecithine) zu spalten vermag, so war daran zu denken, ob nicht Lipoide bei der Komplement-

tätigkeit des Serums eine Rolle spielen, wobei die Globuline (Mittelstück) die Funktion hätten, solche hämolytisch wirksamen Lipoide auf das Antigen zu übertragen.

Aus den Arbeiten von Sachs und Omorokow[1]) sowie von Ritz[2]) ging hervor, daß das Gift eine Substanz des Serums zerstört, die sich durch ihre relative Thermostabilität auszeichnet; sie wurde von Ritz als dritte Komponente des Komplementes aufgefaßt. Auf ihre Existenz wurde daraus geschlossen, daß das mit Cobragift digerierte Serum zwar ein vollwertiges Mittel- und Endstück besitzt, seine Komplementwirkung aber erst dann ausüben kann, wenn geringe Mengen von normalem Mittel- oder Endstück oder von inaktivem Serum zugesetzt werden.

Jonas[3]) hat verschiedene Sera auf ihren Gehalt an dritter Komponente untersucht und gefunden, daß Schweineserum ganz besonders wirksam ist und daß diese Eigenschaft in erster Linie den Globulinen dieses Serums zukommt. Er faßt aber die dritte Komponente als ziemlich unabhängig vom Mittelstück auf, da sie wohl das mit Cobra vergiftete Serum, nicht aber normales Endstück des Meerschweinchenserums zu komplettieren vermag.

Weil[4]) und Nathan[5]) haben die Bindungsverhältnisse der dritten Komponente näher untersucht. Nathan konnte nachweisen, daß sensibilisierte Blutkörperchen aus Cobraserum Mittel- und Endstück aufnehmen („hypersensibilisiert") werden, ohne in Lösung zu gehen; durch Zusatz von isolierter dritter Komponente (inaktives Schweineserum) werden die so vorbehandelten Blutkörperchen hingegen gelöst.

Sachs und Ritz[6]) fanden, daß die Inaktivierung des Komplementes durch Bakterien insofern mit der Cobrainaktivierung eine große Ähnlichkeit hat, als das komplementfreie Anaphylatoxin sich ebenfalls durch die dritte Komponente restituieren läßt. Sachs wies auch auf analoge Verhältnisse bei denjenigen Schädigungen hin, die das Komplement bei Stehen im salzarmen Medium und nach Schütteln (Jacoby und Schütze)[7]) erfährt.

Im Gegensatz zu diesen Forschern, die die Restitution des Cobraserums auf eine von Mittel- und Endstück wesentlich verschiedene Substanz beziehen, hat Braun[8]) und in letzter Zeit Schmidt und Liebers[9]) die Veränderung des Serums durch Cobragift im wesentlichen als eine Schädigung des Mittelstückes aufgefaßt. Schmidt und

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforschung **11**, 710.
[2]) Ebenda **18**, 62.
[3]) Ebenda **17**, 539.
[4]) Diese Zeitschr. **48**, 347, 1913.
[5]) Zeitschr. f. Immunitätsforschung **21**, 259.
[6]) Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Ref. **50**, Beiheft S. 43.
[7]) Zeitschr. f. Immunitätsforschung **4**, 730.
[8]) Diese Zeitschr. **81**, 65.
[9]) Zeitschr. f. Immunitätsforschung **22**, 220.

Liebers nehmen zur Erklärung des Komplementschwundes im Cobraserum Globulinfällungen an, wie sie ähnlich auch durch Schütteln des Serums bedingt werden.

Ausgangspunkt der vorliegenden Untersuchungen war die Entdeckung bestimmter Beziehungen des Cobragiftes zu den Cytozymen; dadurch schien die Möglichkeit gegeben, in das Wesen der Cobrainaktivierung des Serums mit Hilfe der Gerinnungstechnik einzudringen und dadurch eventuell das Problem von der Natur des Komplementes selbst der Lösung näher zu bringen.

Wir haben uns zunächst gefragt, ob das lipolytische Vermögen des Cobragiftes mit dem komplementzerstörenden identisch ist oder ob vielleicht durch bestimmte Eingriffe eine Trennung dieser beiden Wirkungen des Giftes möglich wäre.

Es wurde daher die Hitzeempfindlichkeit stark verdünnter Giftlösungen in dieser Richtung näher untersucht. Das Spaltungsvermögen für Lipoide wurde in diesen Versuchen einerseits durch die Menge des aus Lecithin gebildeten, hämolytischen Körpers, anderseits mit der Gerinnungstechnik geprüft.

Wie wir bereits in einer früheren Mitteilung erwähnt haben[1]), wird die Gerinnungsaktivität der meisten Cytozyme durch Zusatz ganz geringer Mengen von Cobragift in kurzer Zeit zerstört resp. wesentlich geschwächt. Da es sich hierbei um Körper lipoider Natur handelt, ist es naheliegend, diese Wirkung des Giftes auf seinen Lipase-Charakter zu beziehen; es dürfte sich hierbei um eine Spaltung der komplizierter gebauten, hochwirksamen Cytozyme in nicht oder nur noch wenig aktive Substanzen handeln.

Prot. 1. Verschiedene Cytozymemulsionen resp. Lösungen werden in gleicher Menge jeweils mit und ohne Zusatz von 1 Tropfen $1^0/_{00}$ iger Cobragiftlösung mit Serozym und verdünntem $CaCl_2$ 15 Minuten stehen gelassen und hierauf mit Oxalatplasma die Menge des entstandenen Thrombins bestimmt. Die Zahlen bedeuten die Gerinnungszeiten in Minuten:

	Art des Cytozyms				
	Merckscher Herzextrakt	Rinderblutplättchenextrakt wässerig	Alkohol Leberextrakt	Lecithin „Agfa“	Ölsaures Na
Ohne Cobrazusatz	$2^1/_2$′	3′	$2^1/_2$′	20′	25′
Mit Cobrazusatz	fl.	fl.	fl.	fl.	5′

Es zeigt sich eine vollständige Aufhebung der Cytozymwirkung der geprüften Stoffe mit Ausnahme derjenigen des Na-Oleinats, das im Gegen-

[1]) Diese Zeitschr. 68, 163.

teil durch Cobrazusatz wesentlich verstärkt wird. Dieses Verhalten der Ölseife dürfte die oben geäußerte Annahme, daß hier eine Lipasewirkung des Cobragiftes vorliege, bestätigen: die Ölseife als chemisch relativ einfach gebauter Körper kann durch das lipolytische Ferment nicht weiter angegriffen werden und behält deshalb ihren Cytozymcharakter. Die beobachtete scheinbare Verstärkung der Thrombinbildung beruht auf einem eigentümlichen Vermögen des Cobragiftes, einmal vorhandenes Thrombin (welches im vorliegenden Fall ungeachtet dem Cobragiftzusatz aus Seife und Serozym entstanden ist) in seiner Fibrinogen fällenden Kraft zu verstärken; diese Wirkung läßt sich gegenüber jedem Thrombin, unabhängig von der Art des Cytozyms, aus dem es entstanden ist, nachweisen, ist aber besonders bei dem aus Seife gebildeten Thrombin ausgesprochen. Daß es sich hierbei tatsächlich um eine Verstärkung des fertigen Thrombins und nicht um vermehrte Thrombinbildung handelt, zeigt folgender Versuch:

Je 1,0 ccm Seifenemulsion stehen mit Serozym (0,5 ccm) und $CaCl_2$ (1 Tropfen) 15 Minuten. Zu einem Röhrchen werden gleichzeitig mit dem Serozym 3 Tropfen Cobragiftlösung zugesetzt, zu einem zweiten Röhrchen erfolgt dieser Zusatz erst 15 Minuten später mit der Zugabe des Oxalatplasmas, d. h. zu einer Zeit, wo eine weitere Thrombinbildung wegen Ca-Mangel ausgeschlossen ist. Ein drittes Röhrchen bleibt ganz ohne Cobrazusatz. Die beiden ersten Röhrchen gerinnen beide nach 3 Minuten, Röhrchen III nach 18 Minuten.

Nicht immer wird die Gerinnung durch Cobragiftzusatz vollständig aufgehoben; bei Verwendung starker Cytozymdosen zeigt sich bloß eine Verzögerung der Gerinnung als Ausdruck einer wesentlich schwächeren Thrombinbildung. Verschiedene Lipoide (alkohol. Extrakte aus verschiedenen Organen) werden hierbei ungleich stark durch Cobragift angegriffen resp. sie liefern Spaltprodukte, die bald noch etwas gerinnungsaktiv sind, bald nicht mehr[1]).

Die Versuche auf Thermoresistenz des Cobragiftes wurden so vorgenommen, daß $^1/_2$ bis 1 $^0/_{00}$ ige Lösungen in physiologischer NaCl-Lösung 5 Minuten im Wasserbad auf 100° erhitzt wurden. Da bekanntlich das Cobragift in salzsaurer Lösung gegen Erhitzung resistenter ist, haben wir nicht nur neutrale, sondern auch schwach saure Lösungen diesem Eingriff unterworfen. Ferner wurde die Hitzeempfindlichkeit auch in schwach alkalischem Milieu geprüft.

Die folgenden Protokolle zeigen die auffallend große Hitze-

---

[1]) Eine ähnliche, das Cytozym schädigende Wirkung kommt auch dem Saponin zu; diesem Glukosid fehlt jedoch das Vermögen, fertiges Thrombin zu verstärken. Ölsaures Na wird durch Saponin ebenfalls geschwächt.

resistenz des uns zur Verfügung stehenden Cobragiftes in bezug auf seine lipolytische Eigenschaft. Die hämolytische Wirkung desselben hat unter dem Einfluß des Kochens meist nur ganz unwesentlich abgenommen[1]). Auch die Cytozymzerstörung wird durch erhitztes Cobragift noch deutlich bewirkt. Säurezusatz erwies sich hierbei nicht von größerer Bedeutung. Hingegen erfolgt bei Kochen in Lauge eine vollständige Zerstörung der Lipase.

Im Gegensatz zu der beträchtlichen Thermostabilität der lipolytischen Fähigkeit des Cobragiftes ergab sich, wie die Versuche zeigen, eine sehr ausgesprochene Hitzeempfindlichkeit derjenigen Komponente des Giftes, die das Komplement des Serums zerstört: das auf 100° erhitzte Gift war nicht mehr imstande, die Komplementfunktion des Serums merklich zu schädigen. Noch auffallender war der Effekt, den ein vorübergehender Säurezusatz auf die Wirkung des Giftes ausübte. Es genügt, Cobragift durch kurze Zeit mit stark verdünnter HCl stehen zu lassen, um die komplementzerstörende Eigenschaft desselben auch ohne Erhitzung und trotz folgender, sorgfältigster Neutralisierung der Säure dauernd zum Schwinden zu bringen. Die Tatsache einer ganz verschiedenen Empfindlichkeit gegen Hitze und Säure, die die beiden untersuchten Wirkungen des Cobragiftes aufweisen, gestatten mit größter Sicherheit den Schluß, daß die lipolytische und die komplementzerstörende Wirkung des Giftes auf eine wesentlich andere Weise zustandekommen müssen.

Protokoll 2.

Versuch auf Thermostabilität des Cobragiftes bei verschiedener Reaktion des Milieus. Je 1,0 Cobragiftlösung (0,5 ‰) wird mit 0,1 $^{n}/_{50}$-HCl resp. 0,1 $^{n}/_{50}$-NaOH versetzt (Kontrolle mit 0,8 % NaCl-Lösung) und 5 Min. im Wasserbad gekocht. Eine zweite, gleiche Probe bleibt jeweils unerhitzt. Nach 30 Min. wird sorgfältigst neutralisiert.

---

[1]) Die Giftigkeit im Tierversuch war ebenfalls durch Kochen nur wenig herabgesetzt, wie z. B. folgender Versuch zeigt: Maus I erhält 0,5 ccm unerhitzter Toxinlösung subcutan: schwer krank nach 45 Min., tot nach 60 Min. Maus II erhält 0,5 ccm derselben, durch 3 Min. gekochten Toxinlösung: schwer krank nach 60 Min., tot nach 70 Min.

Prüfung auf Lecithinspaltung: a) im Hämolyseversuch. 0,2 einer 1 ‰ Lecithinemulsion (chem. rein „Agfa", 1 % in Alkohol gelöst, davon 10fache Verdünnung durch Einspritzen in NaCl-Lösung) mit absteigenden Mengen Cobragift und gewaschenen Hammelblutkörperchen versetzt. Grad der Hämolyse nach 1 Stunde:

Vorbehandlung des Giftes	Cobragift									
	frisch					gekocht				
	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$	$^1/_{40}$	$^1/_{80}$	$^1/_{160}$	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$	$^1/_{40}$	$^1/_{80}$	$^1/_{160}$
neutral	k.	k.	k.	st.	0	k.	k.	mäßig	0	0
mit $^n/_{50}$-NaOH . .	k.	k.	k.	k.	f. k.	0	0	0	0	0
mit $^n/_{50}$-HCl . . .	k.	k.	k.	k.	f. k.	k.	k.	k.	mg.	0

Geringfügige Abschwächung durch Kochen in neutraler und saurer, vollständige Zerstörung durch Kochen in alkalischer Lösung.

b) Prüfung auf Cytozymzerstörung. Merckscher Herzextrakt 1 : 40 in phys. NaCl-Lösung verdünnt, wird in der Dose 0,1 ccm mit fallenden Cobragiftmengen 15 Min. stehen gelassen (Volumen 0,5 ccm). Hierauf wird Serozym und $CaCl_2$-Lösung zugegeben und nach 15 Minuten mit Oxalatplasma auf Thrombinbildung geprüft. Die Zahlen geben die Gerinnungszeiten des Plasmas in Minuten.

Vorbehandlung des Giftes	Cobragift					
	frisch			erhitzt		
	$^1/_{20}$	$^1/_{60}$	$^1/_{120}$	$^1/_{20}$	$^1/_{60}$	$^1/_{120}$
neutral	fl.	fl.	5′	120′	7′	6′
mit $^n/_{50}$-NaOH . . .	fl.	120′	120′	2′	2′	2′
mit $^n/_{50}$-HCl	fl.	17′	6′	fl.	14′	2′

Kontrolle: 0,1 Extrakt ohne Cobra + Serozym und $CaCl_2$: 2′.

Mäßige Abschwächung der Cytozym zerstörenden Fähigkeit durch Erhitzung in neutraler und saurer Lösung, vollständiger Schwund derselben nach Kochen in alkalischer Lösung, wo die Gerinnungen ebenso gut erfolgen wie ohne Cobrazusatz (Kontrolle).

Prüfung auf Zerstörung des Komplementes.

Die gleichen Cobragiftlösungen wie bisher werden in der Menge 0,3 ccm mit 0,6 ccm Meerschweinchenserum $2^1/_2$ Stunden digeriert, hierauf je 0,1 ccm mit oder ohne Zusatz von $^1/_{200}$ ccm Schweineserum mit sensibilisiertem Hammelblut auf Komplementgehalt untersucht. Hämolysebefund nach 1 Stunde:

Vorbehandlung des Giftes	Cobragift			
	frisch	dito + Schweins.	gekocht	dito + Schweins.
neutral	0	k.	k.	k.
mit $^n/_{50}$-NaOH . .	0	k.	k.	k.
mit $^n/_{50}$-HCl . . .	k.	k.	k.	k.

Das gekochte und das vorübergehend angesäuerte, selbst unerhitzte Cobragift haben das Vermögen, das Komplement zu zerstören, verloren. In dem vorliegenden Versuch wurden fallende Serummengen auf Komplementgehalt geprüft. Da die größeren und kleineren Dosen die gleichen Befunde ergaben, verzichten wir auf eine Wiedergabe der übrigen, die Tabelle beschwerenden Ziffern.

Nachdem durch die mitgeteilten Untersuchungen festgestellt war, daß die eigenartige Schädigung des Komplementes durch Cobragift nicht als Lipasewirkung gelten kann, erhob sich die Frage, ob dieselbe mit einem der anderen Eingriffe, die die Komplementfunktion des Serums herabsetzen, in Analogie gebracht werden könnte.

Aus den eingangs erwähnten Untersuchungen von Sachs und Ritz war bereits bekannt, daß Zusatz von Bakterien ähnlich wie Cobragift zu einem Schwund der „dritten Komponente" des Komplementes führt. Wir haben daher zunächst geprüft, ob für die Veränderungen, die die antikomplementär wirkenden Suspensionen (Bakterien, Inulin, Agar) einerseits, Cobragift andererseits im Serum bedingen, gemeinsame Gesetzmäßigkeiten aufgedeckt werden könnten.

Bekanntlich tritt der durch die Suspensionen bedingte Komplementschwund nicht ein, wenn der Zusatz derselben in hypertonischem Milieu (2% NaCl) erfolgt. Als Erklärung dieser Hemmung haben wir die Vermutung ausgesprochen, daß durch die höhere Salzkonzentration eine Stabilisierung der Serumglobuline bewirkt und dadurch ein Schutz gegenüber den uns beschäftigenden, globulinfällenden Eingriffen gegeben werde.

Es wurde daher untersucht, welchen Einfluß die Hypertonie auf die antikomplementäre Wirkung des Cobragiftes ausübe. Protokoll 3 (Reihe 3) zeigt, daß unter dieser Versuchsanordnung eine irgend nennenswerte Schwächung des Komplementes durch Cobragift nicht nachgewiesen werden kann. Dieser Befund stellt somit eine erste Brücke zwischen dieser Cobrawirkung und den „globulinfällenden Eingriffen" dar.

Eine weitere Übereinstimmung bietet das Verhalten gegenüber Citratsalzen. Es war bereits bekannt, daß einzelne serologische Reaktionen nicht mehr stattfinden können, wenn anstatt physiologischer Kochsalzlösung eine isotonische Natrium-

citratlösung verwendet wird. Diese Beobachtung wurde zuerst in bezug auf die Thrombinentstehung gemacht, die im Citrat- und Oxalatmedium verhindert ist[1]). Später hat Gengou[2]) beschrieben, daß die Cobrahämolysinbildung im Citratmedium nicht auftritt; er hat diese Wirkung des Citrates als eine gegen die Ca-Ionen des Milieus gerichtete aufgefaßt, entsprechend der Ansicht, welche Sabbatani[3]) für die Thrombinbildung entwickelt hatte. Bordet und Gay waren die ersten, die das Ausbleiben der spezifischen Komplementhämolyse im Citratmilieu bemerkten.

Untersucht man auch die übrigen Serumfunktionen, so zeigt sich stets eine deutliche Hemmung bei Ersatz der NaCl- durch Citrat- (oder Oxalat-)lösung, die um so deutlicher ist, je mehr das Serum mit der Citrat(Oxalat)lösung verdünnt wurde (Agglutination, Konglutination usw.). Diese Wirkung ist durch die Bindung der Ca-Ionen allein nicht erklärbar. Denn setzt man nur 1 bis 2 Tropfen einer 1⁰/₀igen Na-Oxalatlösung neben reichlicher NaCl-Lösung zu, so werden die Serumreaktionen (mit einziger Ausnahme der Thrombinbildung) keineswegs gestört (Protokoll 3, Zeile 2). Unter diesen Umständen ist aber alles freie Ca gebunden, wie das vollständige Ausbleiben jeder Thrombinentstehung (die ohne Ca-Ionen nicht stattfinden kann) beweist. Das Wesentliche für die uns beschäftigende Hemmungserscheinung ist somit nicht das Fehlen der Ca-Ionen, sondern überhaupt der Mangel freier Ionen, und alle Reaktionen, die gut dissoziierte Salze zu ihrem Zustandekommen erfordern, gehen im wenig dissoziierten Citratmilieu schlecht oder gar nicht vor sich. Hierher gehört neben den spezifischen Serumfällungen (Agglutination, Präcipitation usw.) auch der Komplementschwund, den der Zusatz von Bakterien, Inulin, Agar usw. im Serum bewirkt. Es gehört aber auch, wie die folgenden Protokolle zeigen, der Komplementschwund, den Cobragift im

---

[1]) Der Grund dieser Hemmung ist in diesem Falle jedoch ein anderer als bei den übrigen Serumreaktionen, wie unten ausgeführt wird. Dieser Unterschied wurde unseres Wissens bisher nicht genügend beachtet.

[2]) Compt. rend. Soc. Biol. 62, S. 409 u. 736. Siehe auch die Untersuchungen des gleichen Autors über die Aalserumhämolyse (ebenda 62), in deren Verlauf derselbe bereits die Rolle der Elektrolyten erkannte.

[3]) Compt. rend. Soc. Biol. 54, 716.

Serum hervorruft, in dieselbe Gruppe. **Im Citratmedium wird Komplement durch Cobragift auch nach längerer Einwirkung nicht wesentlich geschwächt**, die Lösung sensibilisierter Blutkörperchen durch derartig behandeltes Komplement ist häufig eine deutlich bessere als diejenige, die ohne Cobragift in gleicher Citratlösung stehen gelassenes Komplement bewirkt[1]).

Diese Befunde sind ein weiterer Beweis für die von uns ausgesprochene Vermutung, daß die Suspensionen den Komplementschwund des Serums hervorrufen durch gewisse Globulinfällungen, die sie, und zwar nur bei Anwesenheit ionisierter Salze, auslösen; ist der Dissoziationsgrad des Salzes zu gering, so bleibt eine Fällung der Globuline und damit der Komplementschwund aus. Die gleiche Gesetzmäßigkeit gilt auch für die Wirkung des Cobragiftes auf das Serum, wie aus ihrer Abhängigkeit von ionisierten Salzen hervorgeht. Diese Tatsache spricht dafür, daß auch das Cobragift zu den globulinfällenden Eingriffen gestellt werden muß.

Protokoll 3.

Frisches Meerschweinchenserum je 0,4 ccm verdünnt mit 1,6 ccm physiologischer NaCl-Lösung resp. 2 % NaCl-Lösung, 2,1 % Na-Citratlösung, 1 % Na-Oxalatlösung; in Reihe 2 mit 1,5 ccm phys. NaCl-Lösung und Zusatz von 2 Tropfen 1 %iger Na-Oxalatlösung; diese Reihe zeigt, daß der bloße Wegfall dissoziierter Ca-Salze allein noch nicht ausreicht, den Komplementschwund zu verhindern. Die so verdünnten Komplementdosen werden hierauf mit 0,1 bis 0,2 ccm Cobragiftlösung, Inulin resp. Bakteriensuspension versetzt und bleiben 2 Std. im Brutschrank. Hierauf werden die Suspensionen abzentrifugiert und die Abgüsse entsprechend 0,06, 0,04, 0,03 und 0,02 ccm ursprünglichem Serum mit 4fach sensibilisiertem Blut geprüft. Die in Klammern beigefügten Zahlen bedeuten die Zeit bis zum Eintritt des nebenbei notierten Hämolysegrades.

---

[1]) Im Zuckermedium lassen sich diese Vorgänge wegen des spontanen Komplementschwundes, der unter diesen Umständen eintritt (Sachs und Tornuchi, Berl. klin. Wochenschr. **1907**, Nr. 18) nicht deutlich nachweisen.

Art des Milieu	Kein Zusatz		Mit Cobragift		Mit Inulin		Mit Bakterien		
	0,06	0,03	0,06	0,03	0,06	0,03	0,06	0,04	0,02
Phys. NaCl-Lösung . .	k. (20')	k. (20')	0 20' mg. (40')	0 (40')	mg. (40')	0 (40')	0 (15') f. k. (30')	0 (15') mg. (30')	0 (30')
dito + 2 Tropf. Oxalat . .	k. (20')	k. (20')	mg. (20') k. (40')	0 (40')	Sp. (40')	0 (40')	mg. (15') f. k. (30')	Sp. (15') st. (30')	0 (30')
2 % NaCl . .	k. (20')	k. (20')	k. (20')	k. (20')	k. (20')	f. k. (40')	f. k. (15') k. (30')	f. k. (15') k. (30')	st. (15') f. k. (30')
Citratlösung .	f. k. (20') k. (40')	wg. (20') k. 40'	k. (20')	k. (20')	k. (20')	f. k. (40')	f. k. (15') k. (30')	f. k. (15') k. (30')	mg. (15') st. (30')
Oxalatlösung .	f. k. (20') k. (40')	Sp. (20') k. (40')	k. (20')	k. (20')	k. (20')	k. (40')	k. (15')	k. (15')	mg. (15') f. k. (30')

Die Eigenschaft der Suspensionen, globulinfällend zu wirken, ließ sich nicht nur makroskopisch durch vermehrte Trübung des Serums, sondern in vielen Fällen auch durch Auftreten einer positiven Wassermannschen Reaktion nachweisen[1]). Wir haben daher untersucht, ob auch ein mit Cobragift versetztes vorher negatives Menschenserum in der Wassermannreaktion positiv reagieren würde. Diese Versuche scheiterten aber an dem Umstande, daß die zur Wassermannreaktion dienenden Lipoidextrakte unter dem Einfluß schon ganz geringer Cobragiftmengen mit oder ohne Zusatz von Serum die Fähigkeit, positive Sera anzuzeigen, verlieren.

Da die luetischen Sera mit Lipoidextrakten reagieren, hat v. Wassermann auf Grund von Untersuchungen von Porges und Meier[2]) die Vermutung ausgesprochen, daß die Extrakte hierbei als Antigene wirken und die W.R. der Sera auf Substanzen beruhe, die Lipoide abbauen. Eine experimentelle Prüfung dieser Hypothese wurde unseres Wissens von den Autoren nicht in genügender Weise vorgenommen. Es muß aber betont werden, daß für die Annahme, ein eventueller Abbau von Lipoiden müsse durch Komplementbindung nachweisbar sein, kein eigentlicher Grund vorliegt. Zwar wurde von ver-

[1]) Siehe unsere diesbezüglichen Untersuchungen in Berl. klin. Wochenschr. **1914**, Nr. 25.

[2]) Münch. med. W. 1913, S. 1331.

schiedenen Forschern der Komplementschwund bei bestimmten Immunitätsvorgängen mehr oder weniger hypothetisch mit einem Abbau des Eiweißantigens in Beziehung gebracht. Gewiß darf aber daraus nicht geschlossen werden, daß alle Abbauvorgänge sich bei geeigneter Versuchsanordnung durch Komplementbindung äußern müssen. Die Annahme eines Eiweißabbaues durch Komplement ist noch nicht bewiesen; immerhin liegen für dieselbe gewisse experimentelle Daten vor, die eine Diskussion derselben gestatten. Für den Abbau von Lipoiden sprachen hingegen keinerlei experimentelle Ergebnisse. Nach Untersuchungen von v. Gonzenbach[1]) tritt eine mit dem Stalagmometer nachweisbare Spaltung von Lipoiden bei der W. R. nicht ein. Wir haben gefunden, daß durch eine sichere Lipase der Extrakt zerstört wird und hierbei nicht nur das Vermögen, mit luetischen Seren unter Komplementbindung zu reagieren, verliert, sondern auch seine eigene, antikomplementäre Wirkung (Eigenhemmung) einbüßt.

v. Wassermann hat auch behauptet, daß bei Immunisierung mit Organextrakten lipaseartige Antikörper auftreten. In schon früher erwähnten Versuchen, welche Brand in unserem Institute ausführte, wurde geprüft, ob unter diesen Umständen mit der Technik der Gerinnungsreaktion Antikörper gegen Lipoide nachweisbar wären. Es war zu erwarten, daß die Gerinnungsaktivität der zur Immunisierung verwendeten Extrakte (die gute Cytozyme sind) abnehmen würde (ähnlich wie bei Zusatz luetischer Seren), wenn man das Serum des damit immunisierten Tieres zusetzen würde. Brand erhielt zwar Sera, die mit den Extrakten unter Komplementbindung reagierten dieselben aber nicht im Sinne einer positivsn Gerinnungsreaktion beeinflußten. Wir sehen somit, daß durch Vorbehandlung mit Organextrakten eine der W. R. analoge Reaktion des Serums (die sich nicht nur in positiver Komplementbindung, sondern auch in positiver Gerinnungsreaktion äußern müßte) nicht eintritt. Auch diese Versuche sprechen somit gegen die Annahme einer Veränderung des Serums, die als Immunitätsreaktion gegen Gewebslipoide gedeutet werden könnte.

Wir haben somit gesehen, daß sich die lipolytische Wirkung des Cobragiftes mit Leichtigkeit von der komplementzerstörenden trennen läßt, und daß die letztere in der Abhängigkeit von dem Dissoziationsgrad des Milieus mit einer Reihe anderer Eingriffe, die durch Globulinfällungen das Komplement schädigen, übereinstimmt.

Diese Übereinstimmung erstreckt sich nun auch auf den feineren Mechanismus der Komplementzerstörung. Wie aus unserer Einleitung hervorgeht, kann der durch Cobragift bedingte Komplementschwund sowohl durch Mittelstück wie durch

---

[1]) Korresp.-Bl. f. Schweiz. Ärzte, 1915.

Endstück und selbst durch inaktives Serum wieder ausgeglichen werden, was zur Annahme einer thermostabilen, „dritten Komponente“ geführt hat. Die weiteren Untersuchungen von Sachs und Ritz zeigten, daß auch das durch Bakterienzusatz geschädigte Komplement in gleicher Weise restituierbar ist, somit auch hier ein Verlust der dritten Komponente vorliegen dürfte. Wir haben diese Befunde vollauf bestätigen können und gleiche Verhältnisse bei Inulin- und Agarzusatz[1]) beobachtet (s. Prot. 4); wir glauben darin einen Beweis zu sehen dafür, daß die allen diesen Eingriffen zugrunde liegenden Serumveränderungen identisch oder doch sehr ähnlich sein dürften.

Sowohl bei Cobragift wie bei den erwähnten Zusätzen mußte aber die Frage nach der Natur dieses Komplementschwundes offen gelassen werden. Es schien naheliegend anzunehmen, daß hierbei eine bestimmte, die Komplementfunktion ausübende Substanz des Serums durch chemische Umsetzungen zerstört (Cobragift), vielleicht auch an die zugesetzten Suspensionen adsorbiert und mit diesen nach dem Zentrifugieren entfernt würde.

Nun gehört aber noch eine weitere Art des Komplementschwundes in die gleiche Gruppe von Serumveränderungen, nämlich die durch Stehen in salzarmem Milieu bedingte. Schon Sachs und Bolkowska[2]) haben festgestellt, daß die nach Stehen in Verdünnung mit Wasser auftretende Schwächung des Komplementes sowohl durch End- wie durch Mittelstück restituiert wird. Wir haben die Aquainaktivierung näher untersucht und eine ganz ähnliche Restituierbarkeit gefunden, wie sie dem Cobraserum, dem Bakterienanaphylatoxin usw. zukommt. Es läßt sich, wie die Protokolle 4—6 zeigen, auch hier durch relativ geringe Mengen inaktiven Schweineserums die hämolytische Wirkung des Serums weitgehend restituieren.

Es muß allerdings erwähnt werden, daß die Restitution von Aquaserum häufig etwas größere Dosen Schweineserum verlangt, wie sie für

---

[1]) Agar schädigt häufig das Komplement so stark, daß eine Restitution nicht mehr gelingt. Auch für die Wassermannsche Reaktion, die unter diesen Umständen auftritt, haben wir in bezug auf Agar eine Sonderstellung gesehen (Berl. klin. Wochenschr. **1914**, Nr. 25), da hierbei meist Eigenhemmung des Serums beobachtet wird.

[2]) Zeitschr. f. Immunitätsfschg. **7**, 785.

Cobraserum nötig sind. Es spielen hier jedoch die einzelnen Bedingungen des Versuchs eine Rolle, so der Grad der Verdünnung (mit Wasser), die Dauer des Stehens und namentlich das Alter des Serums. Sera, die einige Zeit (1 bis 4 Tage) im Kühlraum (ungefroren) aufbewahrt wurden, erweisen sich den fällenden Momenten gegenüber meist weit widerstandsfähiger als frische Sera. Sie haben z. B. einen absolut zwar verminderten Komplementgehalt, der aber durch weitere schädigende Eingriffe (Aqua, Cobragift, Bakterien) relativ weniger herabgesetzt wird als derjenige frischen Serums (ähnliche Beobachtungen haben auch Sachs und Tornuchi[1]) bei ihren Untersuchungen über den spontanen Komplementtod mitgeteilt). Es hängt dies zweifellos mit einer beim Altern des Serums eintretenden Stabilisierung der Serumkolloide, speziell der im frischen Serum so labilen Globuline zusammen, eine Veränderung, die wohl auch für die schwächere Komplementwirkung solcher Seren verantwortlich zu machen ist. Auch bei derartigen „gealterten“ Seren bewirkt inaktives Schweineserum nicht selten eine wesentliche Verbesserung ihrer Komplementwirkung. Es wäre wünschenswert, daß die z. T. recht komplizierten Gesetzmäßigkeiten, welche diese Phänomene beherrschen und die für die Kenntnis der serologischen Reaktionen noch manche neue Aufschlüsse versprechen, einer eingehenden Untersuchung (speziell vom kolloid-chemischen Standpunkte aus) unterzogen würden.

Die Tatsache, daß somit auch durch bloßen Zusatz von Wasser ein Verlust der dritten Komponente im Serum erfolgt, ist von großem theoretischen Interesse. Denn in diesem Falle wird keine serumfremde, chemisch aktive Substanz zugesetzt, die einen Bestandteil des Serums durch chemische Reaktionen zerstören könnte. Ebensowenig wird irgendein Bestandteil aus dem Serum entfernt. Die Verdünnung mit Wasser hat einzig eine durch den Salzmangel bedingte Veränderung des physikalischen Zustandes der Serumkolloide zur Folge[2]).

---

[1]) Berl. klin. Wochenschr. **1907**, Nr. 16, 17 u. 19.

[2]) Auch Sachs, der ursprünglich zur Erklärung dieser Phänomene ein besonderes Ferment angenommen hatte, schließt sich in seinem Referat im Handbuch von Kolle und Wassermann dieser Ansicht an. Nathan und Ritz haben in noch nicht veröffentlichten Versuchen gefunden, daß durch vorübergehende Behandlung mit Salzsäure die Fähigkeit des Serums, durch Bakterien, Aqua und Cobragift verändert, spez. des Komplementes beraubt zu werden, verloren geht. Somit verhalten sich auch dieser Einwirkung gegenüber, welche sehr wahrscheinlich bloß eine Zustandsänderung der Serum-Kolloide zur Folge hat, die verschiedenen, globulinfällenden Eingriffe ganz analog.

Protokoll 4.

Frisches Meerschweinchenserum wird āā mit einer Verdünnung 1 : 1000 Cobragift, mit einer Suspension von Inulin, von Bakterien (erhitzt), Agar (alle in NaCl-Lösung), ferner mit dem 5- und 10fachen Volumen destillierten Wassers versetzt. Die einzelnen Röhrchen bleiben 2 Stunden stehen, hierauf werden die Suspensionen abzentrifugiert, die Aquaverdünnungen isotonisiert. Die einzelnen Komplementproben werden entsprechend 0,1 und 0,05 ursprünglichem Serum mit sensibilisiertem Blut austitriert, und zwar teils allein, teils mit Zusatz von Globulinen, Albuminen oder von inaktivem Schweineserum (0,1 einer 40 fachen Verdünnung des 30′ bei 56° gehaltenen Serums). Die Globuline und Albumine wurden aus dem gleichen, nicht vorbehandelten Meerschweinchenserum nach **Sachs** (mit $^{n}/_{300}$ HCl) gewonnen und entsprechend 0,1 ursprünglichen Serum verwendet.

Komplementprüfung	Art des Zusatzes												
	Cobragift		Aqua 1 : 5		Aqua 1 : 10		Inulin		Bakterien		Agar		Kontrolle: Zusätze allein
	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	0,1	0,05	
ohne Zusatz	0	0	250′ Sp.	0	40′ k.	60′ mg. 150′ f. k.	60′ mg. 150′ f. k.	150′ st.	150′ st.	150′ Sp.	60′ mg. 150′ f. k.	150′ st.	—
mit Globulinen	14′ k.	16′ k.	25′ k.	40′ k.	14′ k.	28′ k.	10′ k.	14′ k.	40′ k.	25′ k.	12′ k.	16′ k.	0
mit Albuminen	150′ st.	60′ mg. 150′ f. k.	60′ st. 150′ k.	60′ mg. 150′ f. k.	25′ k.	40′ k.	20′ k.	28′ k.	60′ mg. 150′ f. k.	60′ st. 150′ f. k.	28′ k.	45′ k.	0
mit Schweineserum $^{1}/_{400}$	28′ k.	60′ k.	60′ mg. 150′ k.	0	25′ k.	45′ k.	25′ k.	40′ k.	60′ st. 150′ k.	60′ mg. 150′ k.	28′ k.	45′ k.	0

mg. = mäßige, st. = starke Hämolyse; in der letzten Kolonne wurden die verwandten Dosen Globuline, Albumine und Schweineserum allein geprüft.

In diesem Versuch wurde durch verschiedene Eingriffe geschädigtes Meerschweinchenserum hinsichtlich der Restituierbarkeit seiner Komplementwirkung durch Mittel- und Endstück sowie durch Schweineserum verglichen. Es zeigt sich, daß hierbei die Globuline (in der angewandten Dose) am besten wirkten, durchgehends weit besser als die (in gleicher Menge verwendeten) Albumine. Schweineserum hat überall deutlich beschleunigt.

Protokoll 5.

Restituierbarkeit des Komplimentes durch Schweineserum bei verschieden langer Einwirkungszeit von Cobragift und dest. Wasser.

Je 0,5 ccm Meerschweinchenserum mit 0,25 ccm Cobralösung (1°/₀₀) bzw. 2,0 ccm Aqua 4, 3, 2 und 1/2 Stunde stehen gelassen (18°). Geprüft ohne und mit absteigenden Mengen von Schweineserum (inaktiv), entsprechend je 0,05 ursprünglichem Komplement. Diese Dose löst (ohne Zusatz gestanden) in 10 Min komplett.

Menge des Schweineser.	Cobraserum, gestanden				Aquaserum, gestanden			
	4	3	2	1/2 Std.	4	3	2	1/2 Std.
1/200	k. (25′)	k. (50′)	k. (50′)	k. (15′)	k. (50′)	k. (50′)	k. (30′)	k. (15′)
1/600	k. (30′)	k. (60′)	k. (60′)	k. (20′)	f. k. (180′)	f. k. (180′)	f. k. (180′)	k. (35′)
1/1800	k. (60′)	k. (60′)	k. (60′)	k. (20′)	f. k. (180′)	k. (120′)	k. (70′)	k. (35′)
1/5400	k. (120′)	f. k. (180′)	f. k. (180′)	k. (20′)	f. k. (180′)	st. (180′)	f. k. (180′)	k. (35′)
0	0 (180′)	0 (180′)	0 (180′)	k. (20′)	wg. (180′)	wg. (180′)	wg. (180′)	k. (35′)

Protokoll 6.

Vergleich der Restituierbarkeit des Komplementes mit fallenden Mengen (1/200, 1/600, 1/1800) Schweineserum: a) Cobraserum: je 0,5 ccm frisches Meerschweinchenserum mit fallenden Mengen Cobragift (0,25, 0,1, 0,05 ccm). b) Aquaserum, je 0,5 ccm Serum verdünnt mit 4,0, 2,0, 1,0 Aqua dest. c) Zusätze von Bakterien-, Inulin- und Agarsuspensionen. Alle Mischungen bleiben 2 Stunden bei 37°, hierauf wird jeweils eine Serummenge entsprechend 0,05 ursprünglichem Serum auf Komplementgehalt und Restituierbarkeit mit Schweineserum geprüft.

Menge des Schweineser.	a) Cobraser., Cobragift			b) Aquaserum			c) Zusatz		
	0,25	0,1	0,05	1:8	1:4	1:2	Bakt.	Inulin	Agar
1/200	0 (180′)	k. (180′)	k. (15′)	k. (60′)	k. (100′)	k. (40′)	k. (100′)	k. (100′)	mg. (180′)
1/600	0 (180′)	0 (180′)	k. (20′)	k. (100′)	k. (180′)	k. (45′)	f. k. (180′)	0 (180′)	0 (180′)
1/1800	0 (180′)	0 (180′)	k. (35′)	k. (100′)	st. (180′)	k. (100′)	0 (180′)	0 (180′)	0 (180′)
0	0 (180′)	0 (180′)	k. (40′)	f. k. (180′)	0 (180′)	f. k. (180′)	0 (180′)	0 (180′)	0 (180′)

Kontrolle Komplement unbehandelt: k. (10′).

Protokoll 7.

Restitution von Aquaserum durch 1/200 ccm Schweineserum inaktiv (30′ 55°). Je 0,5 frisches Meerschweinchenserum steht 35 Min. bei 37°: a) 4fach mit phys. NaCl-Lösung.

b) āā mit Cobragiftlösung.

c) 1:4, 1:8, 1:12, 1:16 mit Aqua verdünnt.

Hierauf werden fallende Mengen (auf ursprüngliches Serum berechnet) mit sensibilisiertem (10fach) Blut austitriert.

Serum-menge	Serum gestanden in											
	phys. NaCl		mit Cobra		mit Aqua							
	a) allein	b) + Schweine-serum	a) allein	b) + Schweine-serum	1:4		1:8		1:12		1:16	
					a)	b)	a)	b)	a)	b)	a)	b)
0,1	k.	k.	k.	k.	st.	k.	mg.	k.	st.	f. k.	f. k.	k.
0,05	k.	k.	f. k.	k.	0	st.	0	st.	0	st.	mg.	k.
0,025	k.	k.	wg.	k.	—	—	—	—	—	—	—	—

Hämolysebefund nach 30 Min.

Aus dem Vorausgehenden ergibt sich, daß das Cobragift das Serum im Sinne einer Globulinfällung ähnlich wie Zusatz von Bakterien, Agar usw. beeinflußt. Da diese Zusätze das Serum giftig machen (Anaphylatoxin), so haben wir untersucht, ob auch das Cobraserum eine ähnliche toxische Wirkung bedinge. Wie das folgende Protokoll zeigt, war dies nicht der Fall. Die fällende und antikomplimentäre Wirkung des Cobragiftes steht somit in dieser Hinsicht der durch Wasserzusatz bewirkten näher. Auch an „Aquaserum" haben wir (nachdem das Serum wieder entsprechend konzentriert worden war) eine Anaphylatoxinwirkung nicht nachweisen können.

Protokoll 8.

Meerschweinchenserum steht mit Cobragift (2:1 verdünnt) 2 Stunden bei 37° (A). Eine Kontrolle (B) wird mit der gleichen Menge auf 100° erhitzten Giftlösung angesetzt. Die Komplementprüfung ergab:

	Cobragift			
	A. frisch		B. gekocht	
		+ Schweineserum		+ $^1/_{500}$ Schweineserum
0,2	0	k.	k.	k.
0,1	0	k.	k.	k.
0,05	0	mg.	k.	k.

somit eine vollständige Zerstörung des Komplementes in Röhrchen A. Von beiden Seren werden hierauf je einem Meerschweinchen von 250 g 3 ccm intravenös injiziert. Beide Tiere sterben in ganz ähnlicher Weise ohne Krämpfe unter den Symptomen zunehmender Schwäche in 10 bis 15 Min. Sektion: Keine Lungenstarre. Beide Komplemente enthielten somit noch wirksames Cobragift, aber kein nachweisbares Anaphylatoxin.

Wir kommen daher zu dem Schluß, daß die auffallende Veränderung des Serums durch Cobragift nicht auf der chemischen Zerstörung einer bestimmten Substanz (durch Lipasewirkung),

sondern auf einer Zustandsänderung der Globuline beruhen muß, wie dies ganz ähnlich durch eine Reihe von fällend wirkenden Eingriffen (Zusatz von Wasser, von verschiedenen Suspensionen, Schütteln u. a.) verursacht wird. Für diese Annahme spricht die gleiche Beeinflußbarkeit dieser sämtlichen, komplementzerstörenden Faktoren durch Hypertonie und durch schwach ionisierte Salze, sowie die analoge Restituierbarkeit des jeweils verursachten Komplementschwundes.

Schmidt und Liebers haben die Zerstörung des Komplementes durch Cobragift ebenfalls auf Globulinfällungen zurückgeführt, hauptsächlich auf Grund ihrer Beobachtung, daß das ihnen zur Verfügung stehende Cobragift in verdünntem Serum eine direkt sichtbare Trübung hervorruft. Wir haben diesen Befund nicht beobachten können, die von uns auf Grund der oben mitgeteilten Versuche angenommene Fällung liegt daher bei unserm Gifte jenseits der Grenze der direkten Sichtbarkeit.

Was die Restitution der Komplementfunktion betrifft, so hat schon Braun gefunden, daß hierbei in erster Linie die Globulinfraktion wirksam ist, eine Tatsache, die auch aus unseren Protokollen deutlich hervorgeht. Schmidt und Liebers haben gleichfalls zur Erklärung der hohen Wirksamkeit des Schweineserums auf dessen besonderen Gehalt an Globulinen hingewiesen.

Diese Autoren nehmen allerdings an, daß die Schweineglobuline durch besonders wirksame Oberflächen das an die gefällten Globuline des Meerschweinchenserums absorbierte, event. auch das an das Cobragift direkt gebundene Komplement in Freiheit setzen; die für die Restitution durch Schweineserum entwickelten Vorstellungen wären somit ähnliche, wie sie Schmidt auch für die Rolle des Endstückes ausgesprochen hat.

Wir möchten hier aber darauf hinweisen, daß nicht die Albumine, sondern die Globuline des Schweineserums das Komplement restituieren, und daß nicht gut angenommen werden kann, daß den Meerschweinchenalbuminen eine ähnliche Wirkung zukommt wie den Schweineglobulinen. Ferner ist nicht recht ersichtlich, warum so außerordentlich stark adsorbierende Oberflächen, wie sie Schmidt von den Schweineglobulinen annimmt, das Komplement, anstatt es frei zu machen, nicht ihrerseits adsorbieren und dadurch unwirksam machen sollten.

Mit dem Nachweis, daß es sich bei der Schädigung des Serums durch Cobragift um eine auch durch chemisch ganz indifferente Eingriffe erzielbare Veränderung handelt, dürfte die Hypothese einer dritten Komponente des Komplementes etwas an Wahrscheinlichkeit verloren haben. Auch wir möchten uns

der Ansicht, daß die erwähnten Eingriffe in erster Linie auf die Globuline des Serums einwirken, anschließen. Wir müssen zwar zugeben, daß die von Sachs und seinen Mitarbeitern vorgebrachten Argumente, namentlich die scharfe Trennung zwischen Mittelstück und dritter Komponente, für die Existenz einer von der Globulinfraktion unterscheidbaren Substanz sprechen. Trotzdem möchten wir vorläufig von der Annahme eines besonderen Mechanismus zur Erklärung der uns beschäftigenden Serumveränderungen absehen und dieselben auf bestimmte physikalische Vorgänge an den Kolloiden, speziell an den Globulinen zurückführen, bei denen die Albumine vermutlich regulierend eingreifen. Das Rätsel der „dritten Komponente“ wird unserer Ansicht nach gelöst sein, sobald die Rolle, welche die Globuline überhaupt bei der Komplementhämolyse spielen, aufgeklärt sein wird.

Zur Kenntnis der Kohlenhydrate des Fichtenholzes.

Von

Erik Hägglund.

(Eingegangen am 29. Mai 1915.)

Die bis jetzt gemachten Untersuchungen über die Zuckerbildung des Holzes bilden eine umfangreiche Literatur, die über ein ganzes Jahrhundert zerstreut ist. Die zahlreichsten und genauesten Versuche darüber sind in letzter Zeit veröffentlicht. Im allgemeinen hatten diese Untersuchungen das Ziel, eine möglichst hohe Zuckerausbeute zu erreichen, ein Punkt, der eine notwendige Voraussetzung für eine technisch-ökonomische Lösung der Frage betreffs der Spritgewinnung aus Holz ausmacht.

Die Angaben über die Art des erhaltenen Zuckers sind nur wenig und unvollständig. Die ersten Untersuchungen sind im Jahre 1891 von Tollens und Lindsey[1]) veröffentlicht. Diese Forscher haben eine hauptsächlich qualitative Prüfung der Zuckerarten einer Sulfitablauge unternommen. Sie fanden dabei folgende Zuckerarten: Mannose, Galaktose und Xylose. Glucose konnte nicht nachgewiesen werden, aber die Autoren halten ihr Vorkommen für möglich. — Während längerer Zeit wurde dieses Thema nicht bearbeitet. Erst im Jahre 1905 wurden von Krause[2]) eingehendere Untersuchungen über die in die Sulfitablauge gegangenen Zuckerarten des Fichtenholzes gemacht. Die Hauptergebnisse dieser Versuche sollen kurz besprochen werden.

Als Ausgangsmaterial dienten zwei Ablaugen verschiedener Herstellungsart: nach Kochungssystem Mitscherlich und Ritter-Kellner. Bestimmungen des Zuckergehaltes der Ab-

---

[1]) Liebigs Ann. 267, 341, 1891.

[2]) Chem. Ind. 29, 217, 1906.

laugen zu verschiedenen Zeiten des Jahres gaben folgendes Resultat:

Tabelle I.

Mitscherlich-Ablaugen		Ritter-Kellner-Ablaugen	
Datum	Zucker in Gew.-%	Datum	Zucker in Gew.-%
22. V.	0,47	23. V.	0,89
26.	0,49	24.	0,90
27.	0,75	26.	0,91
30.	0,48	27.	0,89
28. IX.	1,10	6. X.	1,63
8. XI.	1,27	8. XI.	2,00
17.	1,48	16.	1,47
21.	1,56	27.	2,02
27.	1,46	—	—
3. XII.	1,56	—	—

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, hat Krause während der Herbstmonate einen bedeutend größeren Zuckergehalt der Ablaugen beobachtet als während der Frühlingsmonate. Er äußert sich darüber folgendermaßen: „Da der Kochprozeß stets in der gleichen Weise geführt wurde — die großen Schwankungen in der Kochzeit und die kleineren in der Kochtemperatur beim Mitscherlich-Verfahren bestanden im Frühjahr ebensogut wie im Herbst —, so kann diese Verschiedenheit im Zuckergehalt der Ablauge wohl nur auf eine wechselnde Zusammensetzung des Holzes zurückgeführt werden. Da dieses immer aus derselben Gegend bezogen wurde, so dürften das Alter der Stämme, die Jahreszeit ihrer Fällung und andere Umstände die Ursachen der obigen Differenzen sein. Positive Angaben hierüber vermag ich jedoch nicht zu machen."

Auf Grund von umfangreichen Untersuchungen über den Zuckergehalt der Sulfitablaugen scheint mir obiger Erklärungsversuch der verschiedenen Zuckermengen in den Ablaugen nicht richtig zu sein. Die Zuckerbildung während der Kochung beruht im wesentlichen auf den Bedingungen: Zusammensetzung der Sulfitlauge-Kochlauge, Kochtemperatur und Kochzeit. Wenn diese Bedingungen bei verschiedenen Kochungen einander gleich sind, erhält man gleichgroße Zuckerausbeuten — unabhängig von dem Alter des Holzes und der Jahreszeit der Fällung der Stämme. Von welchem Einfluß die Zusammensetzung der Kochlauge sein kann, zeigt der Umstand, daß eine

für die Zellstoffherstellung verhältnismäßig unwesentliche Veränderung des Gehaltes an „gebundener“ schwefliger Säure im Vergleich mit dem Gehalt an „freier“ schwefliger Säure der Calciumbisulfitlösung unter Festhaltung der anderen Bedingungen — Kochzeit und Kochtemperatur — Schwankungen der Zuckerausbeuten zwischen 1,75 und 2,70 % verursachen kann.

Für die Zusammensetzung des Zuckers der Ablaugen hat Krause folgende Zahlen erhalten:

Tabelle II.

	Mitscherlich-Ablauge %	Ritter-Kellner-Ablauge %
Gesamtzucker . . .	1,48	1,47
Pentosen	0,47	0,41
Mannose	0,48	0,48
Fructose	0,28	0,25
Galaktose	0,01	0,01
Glucose	—	Spur

Wie man aus der Tabelle ersehen kann, besteht eine Differenz von 0,24 bzw. 0,32 % zwischen dem Gesamtzucker und der Summe der einzelnen Zuckerarten. Dies beruht nach Krause darauf, daß die Menge der einzelnen Zuckerarten sich nicht völlig quantitativ bestimmen läßt, wodurch die Werte etwas zu klein ausfallen.

Aus obigen Zahlen kann der Zuckergehalt des Fichtenholzes nicht berechnet werden, da Angaben über die Menge des Holzes und der Ablauge fehlen.

Klason[1]) hat durch Extraktion mit kochendem Wasser aus dem Fichtenholze 10 % Zucker erhalten. Einige der Zuckerarten in diesem „Holzgummi“ wurden quantitativ bestimmt.

Tabelle III.

	% von dem Holzgummi
Pentosen (Xylose)	24,9
Mannose	6,0
Galaktose	Spur[2])

[1]) Archiv för kemi, mineralogi o. geologi 3, Nr. 6, 1908.

[2]) Aus den Zahlenangaben für die erhaltene Menge Schleimsäure und den Zuckergehalt der Lösung läßt sich ein Gehalt an Galaktose von 6,5 % des Holzgummis berechnen.

Etwa $^2/_3$ des Holzgummis wurden nicht näher untersucht. Auf Grund der starken Rechtsdrehung der Zuckerlösung schien es wahrscheinlich, daß die Hauptmenge aus Glucose bestand.

Eine vornehmlich qualitative Prüfung der Zuckerarten der „Lignocellulose“ aus Tannenholz ist von Koch[1]) unternommen. Der Zucker wurde durch Erhitzung der Lignocellulose mit Wasser bei Temperaturen zwischen 150 und 215° in Lösung gebracht. Dabei konnte Mannose (bei 150°) in reichlicher Menge, Glucose und Fructose nachgewiesen werden. Merkwürdigerweise konnten Reaktionen auf Xylose und Arabinose in den Zuckerextrakten nicht erhalten werden. Dies steht mit früheren Befunden in Widerspruch, kann aber erklärt werden, wenn man bedenkt, daß durch die Vorbehandlung des Holzes mit kalten Säuren und Alkalien aus 2 kg Holzschliff 0,9 kg „Holzgummi“ entfernt wurden. Es ist wohl anzunehmen, daß durch diese energische Behandlung die Pentosen entfernt wurden, so daß sie in dem Residium nicht nachgewiesen werden konnten.

Wenn wir die obenerwähnten Resultate zusammenfassen, geht deutlich hervor, daß weitere Versuche notwendig sind, um die Kohlenhydrate des Fichtenholzes näher kennen zu lernen. Es wurde daher von mir eine erneute Untersuchung dieser Frage vorgenommen, und zwar wurden dabei die Zuckerarten der Sulfitablauge bestimmt. Durch die Sulfitkochung wird der Kohlenhydratanteil des Fichtenholzes fast quantitativ in Lösung gebracht. Während dieses Vorganges zerfällt wohl ein Teil der Zuckermenge. Aber ein solcher Zerfall ist in allen Fällen unvermeidlich, da sogar kochendes Wasser, wenn auch nur langsam, Zucker zu zersetzen vermag. Man ist jedoch berechtigt anzunehmen, daß die Zersetzung des Zuckers bei normaler Kochzeit und Kochtemperatur usw. verhältnismäßig unbedeutend ist.

Versuche.

Die Sulfitablauge, die benutzt wurde, war eine Durchschnittsprobe von mehreren Kochungen. Das spezifische Gewicht der Ablauge betrug 1,0520 bei 15°. Der Zuckergehalt, berechnet als Glucose, war 2,30%. Die Zuckerbestimmung

---

[1]) Dissertation, Freiburg 1909.

wurde mit alkalischer Quecksilberlösung nach der Methode von Glassman[1]) ausgeführt.

Um die Zuckerarten aus der Sulfitablauge zu extrahieren, wurde nach zwei verschiedenen Verfahren gearbeitet. Bei der Extraktionsmethode I, einem Verfahren, das bereits von Tollens und Lindsey[2]) und von Krause benutzt worden ist, wurde 1 l Ablauge mit Calciumcarbonat neutralisiert und auf dem Wasserbade fast bis zur Trockne eingedampft. Dann wurde mit je 300 ccm 50⁰/₀igem Alkohol 5 mal gekocht. Der Alkoholextrakt wurde im Vakuum bei Zimmertemperatur bis zur Sirupkonsistenz eingedampft. Der Sirup wurde mit je 300 ccm kochendem 90⁰/₀igen Alkohol 5 mal extrahiert. Der Extrakt wurde im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur eingedampft. Der Rest wurde in Wasser gelöst und in einen 600-ccm-Meßkolben bis zur Marke gefüllt. Eine Zuckerbestimmung ergab nun, daß nur etwa 50⁰/₀ des Zuckers der Sulfitablauge extrahiert waren. Die bereits erwähnte Operation wurde also noch einmal mit dem Laugensirup vorgenommen. Eine Vermehrung um etwa 10⁰/₀ konnte dabei erhalten werden. Der letztere Extrakt wurde mit der Hauptmenge vereinigt und die Mischung auf 700 ccm eingedampft. Die Zuckerbestimmung ergab nun 2,11⁰/₀ Zucker. Dies macht etwas mehr als 64⁰/₀ der ursprünglichen Zuckermenge aus. Eine vollständige Extraktion konnte ich also nicht erzielen. Nun sind, wie Krause hervorgehoben hat, die verschiedenen Zuckerarten in dem Abdampfrückstand gleichmäßig verteilt, und da die Löslichkeit der einzelnen Zuckerarten in verdünntem Alkohol ziemlich gleich groß ist, so darf man annehmen, daß die prozentuelle Zusammensetzung der Zuckerbestandteile des Extraktes mit derjenigen in der Ablauge übereinstimmt.

Es wurde auch eine andere Methode benutzt, um den Zucker der Ablauge zu extrahieren, Extraktionsmethode II.

1 l von derselben Ablauge wie vorher wurde nach Neutralisation und Filtrierung in heißem Zustande mit 3 l 95⁰/₀igem, kochendem Alkohol unter Umrührung gemischt. Die lignosulfosauren Calciumsalze fielen dabei in feinem, flockigem Zustande aus. Die Alkohollösung wurde filtriert. Die Fällung

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 39, 503, 1906.

[2]) a. a. O.

wurde in wenig Wasser gelöst und wie vorher noch einmal mit siedendem Alkohol behandelt. Die Alkoholextrakte wurden vereinigt und im Vakuum bei Zimmertemperatur bis zum Sirup eingedampft. Der Sirup wurde in möglichst kleinster Menge Wasser gelöst und in heißen 90%igen Alkohol gegossen. Dadurch wurden die noch vorhandenen Ligninverbindungen ausgeschieden. Die Alkohollösung wurde im Vakuum eingedampft und der Restsirup in Wasser gelöst (500 ccm). In dieser Weise konnten 80% der Zuckermenge der Ablauge extrahiert werden.

Auf die Anwesenheit bzw. die Menge der folgenden Zuckerarten wurde geprüft: Xylose, Glucose, Galaktose, Mannose und Fructose.

Auf Xylose wurde qualitativ mit Cadmiumcarbonat und Brom nach der Methode von Tollens und Widtsoe[1]) geprüft. Die Anwesenheit von Xylose konnte dabei nachgewiesen werden. Quantitativ wurde die Xylosebestimmung in bekannter Weise durch Destillation mit Salzsäure nach der Methode von Tollens-Parow ausgeführt. Das Furfurol wurde mit Phloroglucin als Phloroglucid gefällt, aus deren Menge mit den Tabellen Kröbers dann die Xylose bestimmt wurde[2]).

Die Anwesenheit von Glucose wurde in folgender Weise nach Tollens ausgeführt. Eine bestimmte Menge Extrakt (100 ccm) wurde auf dem Wasserbade bis zur Trockne verdampft und dann mit 10 ccm Salpetersäure vom spezifischen Gewicht 1,42 behandelt. Die Salpetersäure wurde auf dem Wasserbade verjagt, der Rückstand in 15 ccm Wasser gelöst. Durch Natronlauge wurde schwach alkalisch gemacht. Dann wurde mit Essigsäure versetzt und unter Erhitzung etwa vorhandene Oxalsäure durch Fällung mit Calciumnitrat gefällt. Nach Konzentrierung des Filtrates und Zusatz von Kaliumacetat sollte bei Anwesenheit von Glucose saures zuckersaures Kalium auskrystallisieren, das durch Überführung in das Silber-

---

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 33, 132, 1900.

[2]) Ein Teil des Sirups wurde nach Ruff und Ollendorf (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 32, 3234, 1899) mit Benzylphenylhydrazin auf Arabinose geprüft. Es wurde dabei auch nach längerem Stehen kein krystallinischer Niederschlag ausgeschieden. Arabinose war also in dem Sirup nicht vorhanden.

salz leicht identifiziert werden konnte. In keinem der beiden Extrakte I und II konnte Glucose nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der Galaktose wurde wie gewöhnlich durch Ermittlung der durch Oxydation mit Salpetersäure entstehenden Schleimsäure ausgeführt. Eine bestimmte Menge Extrakt (100 ccm) wurde zum Sirup eingedampft, mit 60 ccm Salpetersäure (spez. Gew. 1,15) versetzt und auf 20 ccm eingedampft. Nach einiger Zeit hatte sich die Schleimsäure ausgeschieden. Nach Zusatz von 100 ccm Wasser und etwa 0,5 g reiner Schleimsäure (genau eingewogen) zwecks vollständiger Auskrystallisation wurde während 3 Tage stehen gelassen. Die Schleimsäure wurde dann abfiltriert und gewogen.

Mannose wurde als Mannosehydrazon bestimmt. 50 ccm Extrakt wurden mit einer Lösung von 1 g Phenylhydrazin + 1 g Essigsäure versetzt und bei einer Temperatur unter 10° während etwa 12 Stunden stehen gelassen. Das Hydrazon wurde abfiltriert, getrocknet und gewogen. Der Schmelzpunkt des Hydrazons war roh 175 bis 180°. Das Hydrazon war also nicht völlig rein. Der erhaltene Mannosegehalt dürfte folglich ein wenig zu hoch sein.

Bei der Fructosebestimmung wurden 100 ccm Extrakt bis zum Sirup eingedampft, der mit einer heißen Mischung gleicher Teile von absolutem Alkohol und Äther mehrmals behandelt wurde. Dabei geht bekanntlich vorzugsweise nur etwa vorkommende Fructose in Lösung. Die vereinigten Alkohol-Ätherextrakte wurden heiß filtriert, bis zum Sirup eingedampft, in einigen Kubikzentimetern Wasser gelöst und mit etwa 0,5 g $Ca(OH)_2$ versetzt. In der Kälte — Eiskühlung — entsteht dabei Ca-Fructosat. Nach einigen Stunden wurde das Fructosat rasch abgesaugt und mit verdünnter Schwefelsäure in kleinem Überschuß behandelt. Der ausgeschiedene Gips wurde abfiltriert und die Fructosemenge mit Fehlingscher Lösung nach Bertrand[1]) bestimmt. Eine qualitative Prüfung auf Fructose mit Hilfe der Seliwanoffschen Reaktion — Rotfärbung bei Erwärmung mit Resorcin-Salzsäure — gab als Resultat eine schwache aber deutliche Rotfärbung. Die erwähnten Prüfungsmethoden sind auch von Krause benutzt worden, der außerdem noch mit der

[1]) Bull. Soc. Chim. **35**, 1285, 1906.

Neubergschen Reaktion[1]) — Osazonbildung mit α-Methylphenylhydrazin — die Anwesenheit von Fructose nachgewiesen hat.

Wie oben hervorgehoben wurde, kann man annehmen, daß die prozentuale Zusammensetzung der Zuckerextrakte mit derjenigen der Ablauge übereinstimmt. Die gefundenen Zuckermengen können also auf die ursprüngliche Ablauge umgerechnet werden. Man erhält dabei die folgenden Zahlen:

Tabelle IV.

Zuckerarten	°/₀ vom Gesamtzucker		°/₀ der Ablauge	
	I	II	I	II
Xylose	30,0	30,8	0,69	0,71
Mannose	41,7	45,2	0,96	1,04
Galaktose	2,6	2,6	0,06	0,06
Fructose	3,0	2,6	0,07	0,06
Glucose	—	—	—	—
Unbestimmt	22,7	18,8	0,52	0,43
	100,0	100,0	2,30	2,30

Bei der Kochung war die Gesamtflüssigkeit 138 cbm[2]) und die Zellstoffausbeute 15,3 Tonnen (absolut trocken). Mit einer praktischen Ausbeute von 50 % Zellstoff wird das Trockengewicht des Holzes 30,6 Tonnen. Da der Zuckergehalt der Ablauge 2,30 % beträgt, so machen die Kohlenhydrate 10,35 % des Trockengewichtes des Holzes aus. Beachtet man, daß während der Kochung ein Teil der Zuckermenge zersetzt wird, so wird der Klasonsche Befund, daß die Kohlenhydratmengen 10 bis 14 % des Holzgewichtes ausmacht, hierdurch bestätigt.

Werden die oben angegebenen Zahlen auf das Holzgewicht umgerechnet, so erhält man folgende Gehalte:

Tabelle V.

Zuckerarten	% des Holzgewichtes	
	I	II
Xylose	3,11	3,19
Mannose	4,32	4,68
Galaktose	0,27	0,27
Fructose	0,31	0,27
Unbestimmt	2,35	1,95

[1]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **35**, 959, 1902.

[2]) Dabei ist natürlich auch die Feuchtigkeit des Holzes mit eingerechnet.

Durch Gärung der Ablauge wurden 0,95 Vol.-$^0/_0$ reiner Äthylalkohol gewonnen. Berechnet man einen Vergärungsgrad von $90^0/_0$, so läßt sich die Menge gärbarer Zuckerarten nach der bekannten Gleichung $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CO_2 + 2C_2H_5OH$ zu $1{,}63^0/_0$ berechnen. Der unvergärbare Zucker sollte also $0{,}67^0/_0$ ausmachen. Oben erwähnte Untersuchungen geben eine Pentosenmenge von 0,69 bis $0{,}71^0/_0$. Die Zuckermenge, deren Zusammensetzung nicht bestimmt wurde, besteht also aus gärbarem Zucker. Ich nehme mit Krause (a. a. O.) an, daß die Menge der einzelnen Zuckerarten, vor allem die Hexosen, sich nicht völlig quantitativ bestimmen läßt, so daß der unbestimmte Zucker ganz oder zum Teil aus Mannose, Galaktose bzw. Fructose besteht.

Im Anschluß an die obigen Untersuchungen wurde auch die Zusammensetzung der Zuckerlösungen untersucht, die bei der Behandlung des Holzes mit verdünnter Schwefelsäure bei Temperaturen von 150 bis 170° während 30 bis 60 Minuten entstehen. Es ist von mehreren Autoren die Ansicht geäußert worden, daß unter diesen Verhältnissen der Zucker, der erhalten wird, nur aus der Cellulose herstammt. Sie stützen sich dabei vor allem auf den Umstand, daß die Zuckerausbeuten aus Holz und anderen cellulosehaltigen Stoffen ihrem Gehalt an Cellulose annähernd proportional sind. Andere Forscher sind der Ansicht, daß bei so hohen Temperaturen, von denen hier die Rede ist, der Zucker aus dem Kohlenhydratanteil vollständig zersetzt werden soll. Eingehende Untersuchungen darüber wurden nicht ausgeführt. Es war also wünschenswert, diese Frage näher zu prüfen.

Versuch 1.

150 g absolut trockenes Holz (Sägemehl aus Fichtenholz) + 1000 ccm $0{,}5^0/_0$ige Schwefelsäure auf 155 bis 165° während 30 Minuten erhitzt. Erhaltene Menge Zucker 13,5 g (berechnet als Glucose) gleich $9^0/_0$ des Trockengewichtes des Holzes. Folgende Zusammensetzung der Zuckermenge wurde erhalten (Tabelle 6).

Versuch 2.

76 g absolut trockenes Holz + 750 ccm $0{,}5^0/_0$ige Schwefelsäure auf 170° während 45 Minuten erhitzt. Zuckerausbeute

Tabelle VI.

Zuckerarten	Gesamtmenge in g	% der Zuckermenge
Pentosen (Xylose) . . .	4,420	32,7
Mannose	4,810	35,6
Fructose	0,585	4,3
Galaktose	0,450	3,3
Glucose	0,070	0,5
Unbestimmt	3,165	23,6

11,2 g oder 14,5 % des Trockengewichtes des Holzes. Die Zusammensetzung des Zuckers geht aus folgender Tabelle hervor.

Tabelle VII.

Zuckerarten	Gesamtmenge in g	% der Zuckermenge
Pentosen (Xylose) . . .	3,37	30,1
Mannose	4,90	43,7
Fructose	0,53	4,7
Galaktose	0,37	3,3
Glucose	1,56	14,0
Unbestimmt	0,47	4,2

Aus den Tabellen ergibt sich einerseits, daß die Kohlenhydrate des Holzes bei der Behandlung mit verdünnten Säuren (0,5 %ige Schwefelsäure) zuerst herausgelöst werden, anderseits daß die Cellulose bei höherer Temperatur und längerer Zeit auch angegriffen wird, was daraus hervorgeht, daß der Glucosegehalt der Zuckerlösung steigt.

Zusammenfassung.

1. Die Zusammensetzung des Kohlenhydratanteils des Fichtenholzes wurde qualitativ und annähernd quantitativ bestimmt.

2. Die Kohlenhydrate liefern bei der Hydrolyse hauptsächlich Xylose und Mannose, daneben auch Fructose und Galaktose. Glucose konnte nicht nachgewiesen werden.

3. Bei der Hydrolyse des Holzes mit verdünnten Säuren bei höherer Temperatur werden zuerst die Kohlenhydrate in Lösung gebracht. Bei längerer Einwirkung wird auch die Cellulose angegriffen. In diesem Falle konnte Glucose in der Zuckerlösung nachgewiesen werden.

Über die Einwirkung der durchdringenden Radiumstrahlung auf anorganische und Biokolloide. I.

Von

A. Fernau und **W. Pauli.**

(Aus der k. k. Radiumstation im allgemeinen Krankenhause und dem Laboratorium für physikalisch-chemische Biologie der k. k. Universität Wien.)

Mit Unterstützung der Fürst Liechtenstein-Spende.

(Eingegangen am 4. Juni 1915.)

Seit der Erkenntnis der wichtigen Rolle, die der elektrischen Ladung für die Lösungsstabilität von Kolloiden, von denaturiertem (W. B. Hardy) und von nativem Eiweiß (W. Pauli) zukommt, lag es nahe, den Einfluß der Radiumstrahlung auf diese dispersen Systeme zu untersuchen. In der Tat haben auch die von V. Henri und A. Mayer[1]) ausgeführten Versuche die Erwartung bestätigt, daß das Radium mittels des elektronegativen Ladungseffektes seiner β-Strahlen elektropositive Kolloide zur Ausflockung zu bringen vermag. V. Henri und A. Mayer konnten durch Bestrahlung mit 80 mg reinem Radiumbromid, was annähernd 40 mg Radiumelement entspricht, wohl elektropositive Kolloide: Eisenhydroxyd, Magdalarot, Methylviolett, ausfällen, dagegen blieb diese Wirkung bei den negativen Kolloiden: Silber, Kupfereisencyanid und Anilinblau, vollständig aus. Diese Versuche wurden von Jorissen und Woudstra[2]) bei mit Salzzusatz sensibilisiertem Eisenhydroxyd bestätigt und durch den Nachweis eines herabgesetzten Schwellenwertes der Fällbarkeit für bestrahltes Eisen- und Chromhydroxydsol ergänzt.

---

[1]) Eine kritische Zusammenfassung der Literatur gibt C. Neuberg, im Handb. f. Radium-Biol. u. Therapie, I. Teil 1913, J. F. Bergmann, Wiesbaden. V. Henri und A. Mayer, C. r. de la Soc. de Biol. **57**, 33, 1904, C. r. d l'Akad. **138**, 521, 1904.

[2]) Kolloidzeitschrift **8**, 8 1911; **10**, 280, 1912.

Ferner fanden G. Dreyer und O. Hanssen[1]) in Versuchen an Serum und Hühnereiweiß eine durch Acidität begünstigte Koagulierbarkeit bei intensiver und langer Bestrahlung mit Radium, die für Globulin leichter herbeigeführt werden konnte als für Albumin. Dagegen soll Syntonin[2]) weder in saurer noch neutraler noch alkalischer Lösung durch Radiumstrahlung ausflocken. Pferdeserum soll nur bei schwacher Ansäuerung durch Bestrahlung koagulierbar sein. Die wenige Sätze umfassende Mitteilung dieser Autoren enthält keinen Hinweis auf den Reinheitszustand und Elektrolytgehalt der verwendeten Eiweißkörper, oder Parallelversuche mit unbestrahltem Eiweiß bei Säuerung; kurz, in keinem Punkte präzise Angaben. In ähnlichem Sinne bemängeln Jorissen und Woudstra sämtliche bisher vorliegenden Mitteilungen über Bestrahlnng und Kolloidflockung.

Unter diesen Umständen war für eine genauere Untersuchung der Eiweißkörper unter der Einwirkung der Radiumbestrahlung so gut wie die ganze Arbeit noch zu leisten. Wenn auch unser Hauptziel in dieser Richtung gelegen war, so wurde doch die Gelegenheit wahrgenommen, die relativ geringe Zahl von brauchbaren Versuchen an anorganischen Kolloiden in einigen Punkten zu ergänzen.

Zur Bestrahlung dienten in allen Versuchen 78,6 mg Radiumelement in Form von 220 mg Radiumbariumcarbonat, die in einem 22 mm hohen, 10 mm weiten Glasröhrchen von 1,1 mm Wandstärke eingeschmolzen waren. Von einer Glasschicht mit 1,1 mm werden gegen 80 $^0/_0$ der β-Strahlung und 1 $^0/_0$ der γ-Strahlung absorbiert, so daß gegen 20 $^0/_0$ der β-Strahlung[3]) und 99 $^0/_0$ der γ-Strahlung von 78,6 mg Radiumelement auf die Flüssigkeit einwirken konnten. Die Bestrahlung wurde meist an 2,5 ccm Flüssigkeit vorgenommen. Das Radiumröhrchen war direkt in die Flüssigkeit eingetaucht, in die es infolge seiner Schwere vollständig versinken konnte. Die zu bestrahlende

---

[1]) C. r. Paris **145**, 234 bis 236, 1907.

[2]) Die Bemerkung über Syntonin, das in neutraler Lösung benützt wurde, ist nicht verständlich, da die Ausflockung bei Neutralisation ein Hauptmerkmal von Syntonin (Acidalbumin) darstellt.

[3]) Von der Verwendung einer dünneren Glashülle, welche eine bessere Ausnützung der β-Strahlung ermöglicht hätte, wurde mit Rücksicht auf das kostbare, zahlreichen Manipulationen unterworfene Präparat abgesehen.

Flüssigkeit befand sich in ca. 5 cm hohen, 15 mm weiten Proberöhrchen mit flachem Boden. Durch diese Versuchsanordnung war eine möglichst intensive Bestrahlung gewährleistet.

I. Verhalten von Suspensoiden gegen Radiumbestrahlung.

A. Anorganische Kolloide.

Kolloides Eisenhydroxyd.

Von einem gut dialysierten Präparat mit 0,34 % Eisengehalt wurden eine Reihe Proben (je 2 ccm) aus einer Bürette tropfenweise mit Natriumacetatlösung versetzt. Von einer ½ %igen Acetatlösung waren 9 Tropfen nötig, um nach 24 Stunden Trübung hervorzurufen. Von einer 1 %igen Acetatlösung ergab ein Zusatz von 5 Tropfen keine Veränderung, 6 Tropfen Trübung. Eine durch 5 Tropfen 1 %iger Acetatlösung sensibilisierte Kontrollprobe blieb auch nach 5 Tagen klar, während die bestrahlte Probe nach dieser Zeit Trübung zeigte.

Kolloides Cerihydroxyd.

Die schönsten Resultate ergab die Untersuchung von Cerihydroxydsol, das nach unseren Erfahrungen infolge seiner Neigung zur Gallertbildung eines der elegantesten Demonstrationsobjekte kolloider Zustandsänderungen bildet.

Darstellung: 5,5 g Ceriammoniumnitrat wurden in 50 g Wasser gelöst und 4 Tage dialysiert; es wurden 100 ccm Dialysat erhalten.

2 ccm des Cerihydroxydsols gaben mit 2 Tropfen 1 %iger Natriumacetatlösung sofort eine steife Gallerte. In einer solchen Gallerte treten besonders bei etwas größerem Elektrolytzusatz zeitliche Dehydratationsvorgänge ein, wobei unter Abpressen von klarem Wasser die gelbe Gallerte schrumpft und immer mehr das charakteristische Aussehen einer mehr oder weniger gelatinösen Flockung annimmt, eine gewiß für die Theorie der Gallertbildung und die Bedeutung der Hydratation solcher Gelteilchen (Pauli[1]) sehr lehrreiche, eines weiteren Studiums werte Erscheinung.

Unser Cerihydroxydsol erstarrte, ohne vorherige Sensibilisierung durch Elektrolyt, prompt nach 24 Stunden (18°) dauernder Bestrahlung zu einer steifen Gallerte. Da bei diesem Vorgange alle Stadien von Leichtflüssigkeit bis zum festen Aggregatzustande durchlaufen werden, lag es nahe, diese Än-

---

[1]) Kolloidzeitschrift 7, 241, 1910.

derung mittels Viscositätsbestimmungen zu verfolgen. Zum Zwecke der Bestrahlung wurde das Radiumröhrchen in dem weiten Teil des Ostwaldschen Viscosimeters mit einem Seidenfaden eingehängt und nur während der Messung vorsichtig über das Flüssigkeitsniveau herausgezogen. Die Reibungsröhre wurde in dem Ostwaldschen Thermostaten tief eingetaucht und gegen Verdunstung sorgfältig verschlossen gehalten. Die Röhre war mit 4 ccm des Sols beschickt. In den folgenden Tabellen sind die Versuche angeführt.

Durchströmungszeiten t' von bestrahltem Ceriumhydroxydsol.
Wasserwert der Reibungsröhre 253 Fünftelsekunden.

Versuchstemp. 25°				Versuchstemp. 18°	
Nach Std.	t'	Nach Std.	t'	Nach Std.	t'
0	279	$28^1/_2$	363	0	292
$3^1/_2$	276	29	373	2	285
$4^1/_2$	274	$29^1/_2$	385	6	297
6	273	30	403	7	313
9	275	33	799	$8^1/_2$	335
10	274	34	880	9	353
11	275	$34^1/_4$	997	21	Gallerte
12	277	$34^2/_3$	1141		
13	284	35	1308		
15	323	$35^1/_2$	2700		
25	333	$35^3/_4$	4897		
$27^1/_2$	344	36	14663		
28	353				

Unsere Versuche zeigen die höchst interessante Erscheinung, daß die Bestrahlung zunächst eine durch Stunden anhaltende geringe, aber deutliche Abnahme der inneren Reibung bewirkt; worauf erst eine anfangs langsame, dann rasch wachsende Erhöhung der Reibung folgt, die sich in dem einen Versuche bis zu einer Verfünffachung der ursprünglichen Durchströmungszeit verfolgen ließ. Diese Erhöhung der Reibung setzte in unserem Versuche (25°) ziemlich jäh nach einer „Latenzzeit“ von 12 Stunden ein. Bei 18° betrug diese Latenz gegen 6 Stunden. Bei niederer Versuchstemperatur erfolgt die Gallertbildung rascher als bei höherer (bei 18° nach 21 Stunden; bei 25° nach 36 Stunden).

Zur Prüfung der Rolle einer durch die Bestrahlung bewirkten Wasserstoffsuperoxydbildung wurden 2 ccm Cerihydroxydsol mit 0,05 ccm 3 % Perhydrollösung, entsprechend 1,5 mg Wasserstoffsuperoxyd, versetzt, das Sol war auch nach 3 Tagen unverändert.

Spontane Gallertbildung des von uns dargestellten Cerihydroxydsols haben wir auch nach 1 jährigem Stehen in verschlossener, gut ausgedämpfter Flasche nicht beobachtet.

Zur Ermittlung der bei unserer Versuchsanordnung durch die Bestrahlung gebildeten Mengen von Wasserstoffsuperoxyd wurden nach der jodometrischen Methode quantitative Bestimmungen ausgeführt. In neutraler und salzsaurer Lösung (10^{-3}, 10^{-4} n) fanden wir nach 3 Tagen 0,060 bis 0,08 mg H_2O_2; in ammoniakalischer Lösung (10^{-4}, $5{,}10^{-5}$ n) konnten nicht die geringsten Spuren nachgewiesen werden. In den ersten Lösungen war nach 3 tägiger Bestrahlung Maximum und Konstanz des gebildeten Wasserstoffsuperoxyds erreicht, was auf einen Gleichgewichtszustand zwischen Bildung und Zerfall desselben hindeutet.

Von elektronegativen Kolloiden wurden kolloides Gold (nach Zsigmondy) und Molybdänblau mit vollständig negativem Erfolge bestrahlt. Arsen- und Antimontrisulfid zeigten wohl eine Trübung durch Ausscheidung von Schwefel, doch ist diese offenbar auf Wirkung des gebildeten Wasserstoffsuperoxyds zu beziehen.

Als Gegenstück zu dem elektropositiven Cerihydroxydsol wurde das gleichfalls zur Gallertbildung neigende negative Vanadinpentoxyd bestrahlt.

Darstellung: 0,5 g Ammoniumvanadat wurden in einem Schälchen mit 8 bis 10 g 12%iger Salzsäure verrieben; das als roter Niederschlag ausfallende Vanadinpentoxyd auf ein Filter gebracht, 3 mal mit eiskaltem Wasser gewaschen und durch längeres Verreiben mit der nötigen Menge Wasser gelöst. Es wurden nach dem Filtrieren gegen 100 ccm einer klaren rotbraunen Flüssigkeit erhalten, die ohne vollständige Flockung nicht dialysierbar war.

Von diesem Sol gaben 2 ccm, mit 3 oder 4 Tropfen 1%iger Kochsalzlösung versetzt, sofort eine feste Gallerte, mit 2 Tropfen nach 20 Stunden, mit 1 Tropfen trat nach 40 Stunden Gallertbildung ein. Das reine Hydrosol zeigte bei 6 tägiger Bestrahlung Dunkelfärbung, blieb jedoch leichtflüssig. Diese Färbung ist auf Wasserstoffsuperoxyd zu beziehen, denn 2 ccm Sol, mit 1 Tropfen 0,3% Perhydrollösung versetzt, wurden sofort dunkelbraun. Die Messung der inneren Reibung bei Bestrahlung zeigt eine mäßige Zunahme der Viscosität.

Durchströmungszeit von bestrahltem Vanadinpentoxydsol.
Wasserwert 253 Fünftelsekunden. $t' = 20^{\circ}$.

Ursprünglich	320
Nach 8 Stunden	320
„ 22 „	322
„ 47 „	329
„ 56 „	332
„ 72 „	337
„ 96 „	345
„ 120 „	353

Eine unter den gleichen Bedingungen unbestrahlt gehaltene Probe zeigte nur eine geringe spontane Änderung der Reibung.

Ursprünglich	330
Nach 1 Tag	330
„ 2 Tagen	333
„ 4 „	336
„ 5 „	337

Die mäßige Reibungserhöhung bei Bestrahlung darf, wie der folgende Versuch zeigt, auf Wasserstoffsuperoxydwirkung bezogen werden.

4 ccm Vanadinpentoxydsol, mit 0,1 ccm 3 % Perhydrollösung vermischt (= 3 mg H_2O_2), ergaben folgende Reibungsänderung:

Ursprünglich	348
Nach 15 Stunden	364
„ 24 „	364
„ 2 Tagen, 15 Stunden	366;

es wurden 0,05 ccm 3 % Perhydrol neuerdings zugesetzt:

nach 3 Tagen	364
„ 3 „ 14 Stunden .	474;

wieder 0,05 ccm 3 % Perhydrol zugesetzt:

nach 5 Tagen	7500.

Gegen Bestrahlung verhält sich also das negative Vanadinpentoxyd in bezug auf Gallertbildung im Gegensatz zu Cerihydroxyd refraktär, die geringen nachweisbaren Veränderungen lassen sich auf Wasserstoffsuperoxydbildung zurückführen, da dieses Sol zum Unterschied von Cerihydroxydsol gegen Wasserstoffsuperoxyd sehr empfindlich ist.

Auch nach unseren, durch die Verwendung der Viscosimetrie bedeutend verfeinerten Versuchen kann somit an der Bedeutung des Ladungssinnes der typischen Kolloide für ihre Empfindlichkeit gegen Radiumstrahlung nicht gezweifelt werden. Scheinbare Abweichungen konnten auf sekundäre Einflüsse des bei der Bestrahlung gebildeten Wasserstoffsuperoxyds bezogen werden. Die Verwendung der Viscositätsbestimmung zu feinerer Beobachtung der eintretenden Gallertflockung läßt einige bemerkenswerte Einzelheiten im zeitlichen Verlaufe derselben be-

sonders schön erkennen. Es scheint der Koagulation nicht nur eine Periode vollständiger Latenz, sondern auch einer gesteigerten Fluidität vorauszugehen. Vielleicht hängt diese Erscheinung mit jenem Umschlag von stabilisierenden in koagulierende Einflüsse zusammen, der beim Übergang von sehr geringem zum größeren Elektrolytzusatz bei verschiedenen Kolloiden wiederholt beobachtet worden ist. Am eingehendsten ist dieses Verhalten bei Kombinationen von anorganischen Kolloiden mit Schutzkolloiden untersucht (Pauli und L. Flecker)[1]). Unsere Beobachtungen sollen in dieser Richtung noch weiter fortgesetzt werden.

B. Suspensoides Eiweiß.

Bekanntlich verliert Eiweiß bei der Denaturierung durch Hitze seinen lyophilen Charakter und kann daher in diesem Zustande leicht als Suspensoid dargestellt werden.

Zu diesem Zwecke wurde ein aus Rinderserum dargestelltes Albumin durch 6 Wochen gegen destilliertes Wasser von 25° dialysiert. Dasselbe bildete in Anwesenheit von Toluol eine gleichmäßige, so gut wie salzfreie, trübe Emulsion von 2,4 °/₀ Eiweißgehalt, die sich ohne Ausflocken schon 3 Jahre unverändert hält. Verdünnt gibt sie eine vollkommen klare Lösung. Diese Stammlösung wurde für unsere Versuche 1:20 mit Wasser verdünnt und gab dann aufgekocht eine opalescente, vollkommen haltbare Suspension denaturierten Eiweißes. Dieselbe wurde nach Bedarf mit entsprechenden Zusätzen stets auf die Hälfte verdünnt, so daß ein Eiweißgehalt von 0,06 °/₀ resultierte. Mit Acetat-Essigsäuregemisch 4 : 1 gab dieselbe eine maximale Flockung, entsprechend einer isoelektrischen H-Ionenkonzentration von $n\text{-}0{,}45 \cdot 10^{-5}$. Die Acetatkonzentration wurde hierbei wie bei allen weiteren Versuchsreihen konstant gehalten. Eine nur mit Wasser hergestellte Probe der suspensoiden Eiweißlösung (0,06 °/₀) ergab nach 5 tägiger Bestrahlung geringe Bildung von Flocken; die Kontrollprobe war unverändert.

Die folgenden Versuche beruhen naturgemäß auf bloßer Schätzung der Flockungen und geben nur einen allgemeinen Überblick. Dennoch zeigen sie übereinstimmend, daß der Pufferzusatz auch in Fällen, wo in den unbestrahlten Proben keine oder nur eine geringe Flockung eintrat, ausnahmslos die Flockung durch die Bestrahlung begünstigt. Die Bestrahlungsflockung tritt auch weit außerhalb der isoelektrischen Zone sowohl nach der sauren (Essigsäure : Acetat 1 : 1) als auch nach der alkalischen Seite (1 : 8) ein und ist noch bei hochverdünnten Puffern (0,002 n-Salzgehalt) sehr deutlich.

[1]) Diese Zeitschr. 41, 461, 1912.

Reihe mit Acetatgehalt 0,02 n.

1. Essigsäure : Acetat 1 : 4; $0{,}45 \cdot 10^{-5}$ n-H

Nach	Bestrahlt	Unbestrahlt
1 Stunde	zum größten Teil abgesetzt, überstehende Flüssigkeit im Klären	feine Flockung
2 Stunden	Absitzen schreitet fort	gröbere Flockung
2,5 "	starker Niederschlag	gröbere Flockung, noch nicht im Absitzen

2. Essigsäure : Acetat 1 : 3,5; $0{,}51 \cdot 10^{-5}$ n-H.

Nach	Bestrahlt	Unbestrahlt
$^3/_4$ Stunden	feine Flocken	unverändert
1,5 "	größtenteils abgesetzt	"
3,5 "	abgesetzt	Beginn der Flockung

3. Essigsäure : Acetat 1 : 3; $0{,}60 \cdot 10^{-5}$ n-H.

Nach	Bestrahlt	Unbestrahlt
1 Stunde	grobe Flocken	unverändert
2,5 Stunden	fast vollständig abgesetzt, überstehende Flüssigkeit klar	teilweise abgesetzt, überstehende Flüssigkeit noch opalisierend

4. Essigsäure : Acetat 1 : 6; $0{,}30 \cdot 10^{-5}$ n-H.

Nach	Bestrahlt	Unbestrahlt
1 Stunde	zahlreiche grobe Flocken	unverändert
$1^3/_4$ Stunden	Beginn des Absitzens	"
3 "	größtenteils abgesetzt	"
4 "	fast vollständig abgesetzt, überstehende Flüssigkeit klar	"

5. Essigsäure : Acetat 1 : 8; $0{,}225 \cdot 10^{-5}$ n-H.

Nach	Bestrahlt	Unbestrahlt
3 Stunden	Beginn der Ausflockung	unverändert
18 "	fast vollständig abgesetzt, überstehende Flüssigkeit klar	Beginn des Absitzens

6. Essigsäure : Acetat 1 : 10; $0{,}18 \cdot 10^{-5}$ n-H.

Nach	Bestrahlt	Unbestrahlt
18 Stunden	etwas trüber	unverändert

7. Essigsäure : Acetat 1 : 2; $0{,}9 \cdot 10^{-5}$ n-H.

Nach	Bestrahlt	Unbestrahlt
12 Stunden	im Absetzen	unverändert
22 "	abgesetzt	"

Reihe mit Acetatgehalt 0,002 n.

1. Essigsäure : Acetat 1 : 1; $1{,}8 \cdot 10^{-5}$ n-H.

Nach	Bestrahlt	Unbestrahlt
18 Stunden	fast vollständig abgesetzt	unverändert

2. Essigsäure : Acetat 1 : 2; $0{,}9 \cdot 10^{-5}$ n-H.

Nach	Bestrahlt	Unbestrahlt
$^1/_2$ Stunde	feine Flocken	unverändert
$^3/_4$ Stunden	grobe Flocken; Beginn des Absetzens	feine Flocken
$^5/_4$ „	zum Teil abgesetzt	„ „
1,5 „	größtenteils abgesetzt	Beginn des Absetzens

3. Essigsäure : Acetat 1 : 3; $0{,}6 \cdot 10^{-5}$ n-H.

Nach	Bestrahlt	Unbestrahlt
$^1/_2$ Stunde	feine Flocken	unverändert
1 „	Beginn des Absetzens	„
2 Stunden	vollständig abgesetzt	feine Flocken
5 „	—	fast vollständig abgesetzt

4. Essigsäure : Acetat 1 : 4; $0{,}45 \cdot 10^{-5}$ n-H.

Nach	Bestrahlt	Unbestrahlt
1,5 Stunden	im Absetzen	Flocken
2,5 „	fast vollständig abgesetzt	Beginn des Absetzens

5. Essigsäure : Acetat 1 : 8; $0{,}225 \cdot 10^{-5}$ n-H.

Nach	Bestrahlt	Unbestrahlt
22 Stunden	vollständig ausgefallen; überstehende Flüssigkeit klar	unverändert

6. Essigsäure : Acetat 1 : 10; $0{,}18 \cdot 10^{-5}$ n-H.

Nach	Bestrahlt	Unbestrahlt
4 Tagen	unverändert	unverändert

Die höchst auffällige Erscheinung, daß die Bestrahlungsflockung in einem weiten Bereiche der H-Ionenkonzentration auftritt, veranlaßte die folgenden Versuche mit Alkali- und Säurezusatz zu suspensoidem Eiweiß.

In der ersten Reihe wurde Essigsäure zugefügt, die in dem verwendeten Eiweißsuspensoid von 10^{-4} n-Konzentration

angefangen Ausflockung hervorrief. Wie unsere Beobachtungen zeigen, wird nicht nur diese Flockung durch Bestrahlung begünstigt, sondern auch bei niederem Essigsäuregehalt, der für sich nicht flockt, durch Radiumstrahlung vollständige Koagulation bewirkt.

Reihe mit Essigsäurezusatz.

Endkonzentration der Säure	Stunden	Bestrahlt	Unbestrahlt
$5 \cdot 10^{-5}$ n	20	abgesetzt	unverändert
$1{,}5 \cdot 10^{-4}$ n	2 6	größtenteils abgesetzt abgesetzt, überstehende Flüssigk. klar	kleine Flocken im Absetzen; Flüssigkeit noch opalisierend
$2 \cdot 10^{-4}$ n	2 4 14	feine Flocken Beginn des Absetzens abgesetzt, Flüssigkeit klar	unverändert Flocken im Absetzen; Flüssigkeit opalisierend
$2{,}5 \cdot 10^{-4}$ n	6 20 24	Flocken größtenteils abgesetzt vollständig abgesetzt	unverändert Beginn der Flockung Flockung

Während die Wirkung des Säurezusatzes, der zu einer elektropositiven Aufladung der Eiweißteilchen führt, noch im Sinne der Bestrahlungsversuche an elektropositiven typischen Kolloiden zu deuten wäre, fällt diese Erklärung gänzlich fort für die folgenden Versuche mit Ammoniakzusatz zum suspensoiden Albumin, der eine stärkere negative Aufladung bewirkt und das Albumin gegen spontane Ausflockung weiter stabilisieren müßte. Dennoch zeigt sich eine merkliche Koagulationsbegünstigung durch die Bestrahlung bei niederem Ammoniakzusatz, verglichen mit dem Verhalten der rein wässerigen Eiweißsuspension. Erst bei 10^{-4} n-NH_4OH bleibt diese Flockungsbeförderung durch die Bestrahlung aus.

Reihe mit Ammoniumhydroxyd.

Endkonzentration der Lauge	Stunden	Bestrahlt	Unbestrahlt
10^{-5} n	48	ausgeflockt	unverändert
$2 \cdot 10^{-5}$ n	24 36	unverändert ausgeflockt	unverändert „
$5 \cdot 10^{-5}$ n	48 57 60	unverändert Flocken abgesetzt	unverändert „ „
10^{-4} n	72 96	unverändert „	unverändert „

Die Versuche mit Laugenzusatz scheinen uns dafür zu sprechen, daß nicht allein der Ladungssinn des suspensoiden Albumins für seine Stabilität gegen die Strahlungsflockung maßgebend ist. Es dürfte vielmehr dem Elektrolytgehalt überhaupt eine gewisse Bedeutung für die Stabilität zukommen, und ebenso wie schon 0,002 n-Pufferkonzentration in weiten Grenzen des H-Ionengehalts in dieser Hinsicht wirksam sind, so könnten die bei geringem Laugenzusatz gebildeten Mengen des Proteinalkalisalzes bereits als Elektrolyt auf das Eiweißsuspensoid wirken.

Jedenfalls zeigen unsere Versuche, daß dem suspensoiden Eiweiß gegenüber den anorganischen Suspensoiden trotz mancher Übereinstimmung eine sehr bemerkenswerte Sonderstellung im Verhalten gegenüber der Radiumstrahlung zukommt. Wie die Ergebnisse des nächsten Abschnittes dartun, treten neue und scharfe Unterschiede beim Übergang von suspensoidem zu nativem Albumin auf.

II. Versuche mit nativem Albumin.

Zu unseren Versuchen stand ein mittels Ammonsulfathalbsättigung aus Rinderserum vom Globulin befreites, durch Ganzsättigung gefälltes und durch fast 3 Monate dialysiertes salzfreies Albumin von seltener Reinheit zur Verfügung. Das Produkt war so rein, daß es auch durch Elektrodialyse nicht weiter fraktioniert werden konnte. Die Lösung enthielt 1,21 % Albumin. Die Bestrahlung wurde in der gleichen Weise wie in den vorhergehenden Versuchen an 2,5 ccm Albuminlösung vorgenommen. Ausnahmslos waren unter den gleichen Bedingungen wie bei der bestrahlten Probe unbestrahlte Kontrollproben angesetzt, alle wesentlichen Versuche waren eindeutig reproduzierbar. Ein solches Albumin zeigte nach längerer Bestrahlung eine Ausflockung. In allen Versuchen wurde als zur Koagulation nötige Bestrahlungsdauer die Zeit bis zum Auftreten der ersten gegen schwarzen Hintergrund merklichen Trübung gerechnet. Über den Verlauf eines solchen Versuches unterrichtet folgende Zusammenstellung.

Temperatur 15°.

Nach 3 Tagen 21 Stunden beginnende Trübung.
" 5 " stärkere Trübung, noch nicht abgesetzt.
" 6 " im Absetzen.
" 11 " abgesetzt; überstehende Flüssigkeit klar.

Es wurde durch ein kleines Filterchen filtriert und das Filtrat wieder bestrahlt.

Nach 3 Tagen 17 Stunden beginnende Trübung.
„ 7 „ abgesetzt; überstehende Flüssigkeit klar.

Das Filtrat wurde wieder bestrahlt, blieb aber auch nach 10tägiger Bestrahlung vollkommen klar und gab mit Ferrocyankalium und Essigsäure keine Trübung mehr.

Es ist also *durch Bestrahlung möglich, das gesamte Albumin zur Ausflockung zu bringen,* wozu in unserem Falle 18 Tage nötig waren. Der ausgeflockte Niederschlag war in Wasser und neutraler Salzlösung unlöslich, in Alkali löslich. Das Albumin kann demnach als vollständig denaturiert im üblichen Sinne bezeichnet werden.

Die Strahlungsflockung wird in großem Maße durch den Temperaturanstieg befördert. Darüber belehrt die folgende Versuchsreihe:

Bei	15°	beginnende Trübung	nach	3 Tagen	18 bis 21	Stunden.
„	25°	„	„	„ 2 „	20	„
„	37°	„	„	„	20	„

Der sichtbaren Ausflockung gehen in der klaren Albuminlösung nachweisbare Zustandsänderungen voraus. Am auffälligsten ist die *gesteigerte Gerinnbarkeit durch Hitze.* Wie aus früheren Arbeiten des biologischen Laboratoriums hervorgeht, lassen sich bei Einhaltung bestimmter Kautelen, vor allem eines gleichmäßigen zeitlichen Wärmezuwachses, entgegen der Auffassung von *Chick* und *F. Martin*[1]), genügend scharfe vergleichende Bestimmungen der Gerinnungstemperatur ausführen. Zur Bestimmung wurde stets ein und dasselbe dünnwandige Glasröhrchen von 10 mm innerer Weite und 20 cm Höhe mit genau 1 ccm Eiweißlösung verwendet. Das Röhrchen war an das Thermometer mittels Gummiringes befestigt, wurde in ein mit auf 35° vorgewärmtem Wasser gefülltes großes Becherglas getaucht und die weitere Erwärmung unter gleichmäßigem Rühren mit einem dünnen Glasstabe so vorgenommen, daß pro Minute eine Temperaturerhöhung um 1° eintrat.

Der Beginn der Trübung war gegen schwarzen Hintergrund scharf zu beobachten, während das Eintreten der Opazität bis zur Unlesbarkeit einer Schriftprobe sich nur auf einen halben Grad genau feststellen ließ. Die Gerinnungstemperatur unseres

---

[1]) Kolloidchem. Beih. 5, 49, 1913.

salzfreien Albumins ermittelte sich für die beginnende Trübung mit 55 bis 55,5° und für vollständige Opazität mit 56°. Die folgende Tabelle zeigt den anfangs starken, dann allmählichen Abfall der Gerinnungstemperatur mit steigender Bestrahlungsdauer:

Bestrahlungszeit . . .	7 St.	13½ St.	22 St.	40 St.	48 St.	80 St.
Beginn der Trübung bei	53°	51°	49,5°	47°	47°	47°
Opazität bei	54,5°	53°	51°	48,5°	48,5°	48,5°

Die stets aufgestellten unbestrahlten Kontrollproben zeigten beginnende Trübung bei 55 bis 55,5° und wurden bei 56° opak.

Der Nachweis, daß die Bestrahlung zur Denaturierung des Eiweißes führt, sowie der Umstand, daß elektronegative Kolloide keinerlei Änderungen durch die Bestrahlung erkennen lassen, legen es nahe, die Ausflockung des elektronegativen Eiweißes nicht etwa als einfache Entladungserscheinung, sondern als Folge seiner Denaturierung zu betrachten. Aus den Arbeiten von Pauli mit Handovsky und Brüll geht hervor, daß die zur Denaturierung führende Hitzeeinwirkung und Alkoholgerinnung durch Zusatz von kleinen Mengen Neutralsalz gehemmt werden, und so unternahmen wir, den Einfluß des Salzzusatzes auf die Ausflockung durch die Radiumstrahlung zu studieren. In der Tat zeigte sich, wie unsere Versuche erweisen, die erwartete Salzwirkung in ganz ausgiebigem Maße.

10 ccm der salzfreien Albuminlösung wurden mit 0,5 ccm 1 n-KCl-Lösung versetzt und 2,5 ccm dieser 0,05 n-KCl enthaltenden Flüssigkeit bestrahlt.

Die Probe bei 15° zeigte unter Bestrahlung erst nach 14 tägigem Stehen beginnende Trübung, bei 37° nach 2 Tagen 18 Stunden. Die bestrahlte salzfreie Probe ließ schon nach 3,5 Tagen bzw. 20 Stunden beginnende Trübung beobachten.

Daß Neutralsalzgehalt, ähnlich wie dies von Pauli und Handovsky für die Hitzegerinnung nachgewiesen wurde, auch bei Bestrahlung vorwiegend die Ausflockung und nur in geringem Maße die Denaturierung hemmt, geht aus dem Verhalten des bestrahlten Salzeiweißes bei der Hitzegerinnung hervor.

So zeigte eine bei 15° durch 8 Tage bestrahlte Probe erwärmt eine beginnende Trübung bei 37°, vollständige Undurchsichtigkeit bei 38°. Dagegen lagen für die unbestrahlte salzhaltige Kontrollprobe die entsprechenden Gerinnungstemperaturen bei 61 bis 61,8°.

Dieser Versuch lehrt, daß die infolge Salzgehaltes trotz 8 tägiger Bestrahlung noch klar gebliebene Probe eine ganz gewaltige Herabminderung der Gerinnungstemperatur erfahren hat, in der die erhöhte Bestrahlungsdauer deutlich zum Ausdruck kommt. Gegenüber der Koagulationstemperatur einer unbestrahlten Kontrollprobe beträgt die Erniedrigung 24°.

Ähnlich wie die Hitzegerinnbarkeit wird auch die Alkoholfällbarkeit des Albumins durch die Bestrahlung ganz bedeutend gefördert. So zeigte sich nach 65 stündiger Bestrahlung der Schwellenwert für die Alkoholfällung auf rund die Hälfte herabgesetzt. Zu diesen Versuchen wurde ein Gemenge von 0,5 ccm Albumin und 2 ccm Wasser verwendet.

	Unbestrahlt	Bestrahlt
Beginnende Trübung	0,6 ccm	0,3 ccm 95% Alkohol
Opazität	0,8 "	0,4 " " "

Die relativ niedrige Reibung unseres Albumins zeigte bei Bestrahlung keine sichere Veränderung.

Im Sinne unserer Annahme, daß die koagulierende Wirkung der Radiumstrahlung auf das Eiweiß als Ergebnis einer Denaturierung, also einer tieferen molekularen Veränderung zu betrachten sei, sprechen auch die folgenden Versuche:

Wie aus den Arbeiten von Pauli und Handovsky[1]) hervorgeht, kommt es durch Säurezugabe zu Eiweiß zu einer bedeutenden Erhöhung der inneren Reibung, die auf die Bildung elektropositiver, stark hydratisierter Proteinionen zurückzuführen ist. Eine jede Rückbildung elektrisch neutraler Teilchen aus diesen positiv geladenen führt zu Reibungsabfall. Wie der nächste Versuch lehrt, bewirkt die Bestrahlung mit Radium keinen Abfall der inneren Reibung von Säureeiweiß.

Das Radiumröhrchen war während der Bestrahlung mittels Seidenfadens direkt in die Reibungsröhre eingehängt, die mit 4 ccm Albumin von dem Gehalte 0,015 n-HCl beschickt war, und wurde nur während der Messung herausgezogen. Das Resultat war ein negatives. Auch nach 6 tägiger Bestrahlung war die innere Reibung dieselbe wie in der Kontrollprobe.

Das Säureprotein verhält sich bei der Bestrahlung demnach nicht etwa wie ein anorganisches elektropositives Kolloid, sondern wie ein Salz (Proteinchlorid), was durchaus mit ander-

[1]) Biochem. Zeitschr. 18, 340, 1909.

weitigen Erfahrungen übereinstimmt. Das native elektrolytfreie Albumin zeigt bekanntlich eine schwach elektronegative Ladung, erkennbar an seiner anodischen Wanderung im elektrischen Strom (Wo. Pauli, L. Michaelis). Diese negative Ladung hängt mit dem etwas überwiegenden Säurecharakter des Albumins zusammen, der durch die Dissoziation von H-Ionen bestimmt ist. Würde die Bestrahlung die elektrische Ladung von Eiweiß ändern, dann würde dies in einer Änderung der H-Ionenkonzentration zum Ausdruck kommen. Wir haben deshalb mit einer neu konstruierten Wasserstoffelektrode für pufferarme Flüssigkeiten hohen Widerstandes die H-Ionenkonzentration in bestrahlten und unbestrahlten Albuminproben elektrometrisch gemessen. Als Bezugselektrode diente eine 1 n-KCl-Kalomelelektrode, die Meßbrücke hatte 100 Ohm.

Versuch.

Untersuchte Flüssigkeit		Gaskette	Normalelement	Volt	$C_H \times 10^5$
Salzfreies Albumin	Unbestrahlt	28,75	48,99	0,5977	0,339
	3 Tage bestrahlt	28,68	49,00	0,5962	0,360
Albumin + 0,05 n-KCl	Unbestrahlt	29,18	48,95	0,6072	0,236
	8 Tage bestrahlt	29,20	48,93	0,6078	0,233

Wir können nach diesen Versuchen einen Einfluß der Bestrahlung auf die elektrische Ladung von nativem Eiweiß nicht mit Sicherheit feststellen.

Schließlich haben wir uns überzeugt, daß für die Bestrahlungswirkung auf natives Eiweiß die Rolle anwesenden Neutralsalzes den Einfluß der H-Ionenkonzentration gewaltig überwiegt. Versetzt man nämlich das native Albumin mit Acetatessigsäuregemisch 1 : 1, was annähernd dem isoelektrischen Punkte entspricht, so findet keine Begünstigung, sondern eine Hemmung der Ausflockung bei der Bestrahlung statt, die nach den Versuchen mit Kaliumchlorid auf das Salz zu beziehen ist.

10 ccm Albumin wurden mit 0,5 ccm 1 n-Puffermischung versetzt. Von dieser, 0,05 n-Acetat enthaltenden Lösung wurden 3 ccm bestrahlt. Nach 11 Tagen beginnende Trübung, nach 12 Tagen Ausflockung.

Der Gegensatz von nativem zu suspensoidem Eiweiß, dessen Lösungsstabilität gegen Bestrahlung durch Elektrolytzusatz ganz gewaltig herabgesetzt wird, ist also ein bedeutender. Für den ersten Fall kommt eben die Beeinflussung des von der Strah-

lung bewirkten Denaturierungsprozesses durch den Elektrolytgehalt in erster Linie in Betracht, während im zweiten Falle ein schon denaturiertes Eiweiß vorliegt, das durch die zugesetzten Elektrolyte für die Flockung durch Radiumstrahlung sensibiliert erscheint, wie dies bei gewissen Suspensoiden (Jorissen und Woudstra) auch in unseren Versuchen erkennbar war.

Durch unsere Versuche ist eine direkte Einwirkung der durchdringenden Radiumstrahlung auf das native Eiweiß festgelegt. Die Einwirkung besteht in einer nach mehr oder minder langer Bestrahlung auftretenden irreversiblen Zustandsänderung des Proteins, die schließlich in Koagulation übergeht. Diese Zustandsänderung zeigt mannigfache Beziehungen zu der durch Hitze erfolgenden Denaturierung von Eiweiß, wie sie schließlich auch bei stärkerer Einwirkung von Alkoholen, Phenolen, hochkonzentrierten Neutralsalzen eintreten kann. Das Wesen aller dieser Denaturierungsvorgänge erscheint heute noch in Dunkel gehüllt, und die an sich nicht unwahrscheinliche Vorstellung, daß es sich dabei um Anhydridbildung, vielleicht unter Ringschließung, handelt, ist zurzeit noch unbewiesen.

Der Nachweis einer direkten, auch ohne sichtbare Koagulation feststellbaren, tiefergreifenden Proteinänderung durch die Radiumstrahlung ist gewiß von nicht geringer Bedeutung für das Verständnis der bisher nur auf schwankenden Grundlagen gedeuteten biologischen Wirkungen dieser Strahlung.

Diese Bedeutung tritt dadurch noch schärfer hervor, daß das Eiweiß den Träger der Arteigenheit und wohl auch in der Hauptsache der Organspezifität darstellt, und daß den Zell- und Gewebsproteiden unzweifelhaft eine komplexere und deshalb empfindlichere Konstitution zukommt als dem von uns untersuchten zirkulierenden Serumalbumin.

Unsere Untersuchungen, die noch in einer Reihe wesentlicher Punkte zu ergänzen sind, sollen auch nach dieser Seite erweitert werden.

Zur Kenntnis der Eiweißkörper.

II. Über die Bindung des Ammoniaks in den Eiweißkörpern.

Von

A. C. Andersen und Regitze Roed-Müller.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Kgl. tierärztlichen und landwirtschaftlichen Hochschule, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 6. Juni 1916.)

Wie der eine von uns früher mitgeteilt hat[1]), gelang es nicht, durch Einwirkung von Pepsin, Trypsin und Erepsin auf verschiedene Eiweißkörper diese vollständig abzubauen, trotzdem die Versuchsbedingungen in verschiedener Weise variiert wurden. Es ergaben sich Präparate, die bei der Spaltung mit Salzsäure unter Druck weiter hydrolysiert werden konnten, wobei sich neben neuen, freien Aminogruppen erhebliche Ammoniakmengen bildeten. Es fragt sich nun, woher das Ammoniak stammt, d. h. aus welcher Verbindung es losgelöst wird.

Wir haben es versucht, dieser Frage näherzutreten, und um mit einem käuflichen Ausgangsmaterial von einigermaßen konstanter Zusammensetzung arbeiten zu können, wählten wir das „Casein nach Hammarsten" — von der Firma C. A. F. Kahlbaum, Berlin — als Versuchsobjekt.

Wieviel Ammoniak ist im Caseinmolekül vorhanden?

Schon die Beantwortung dieser Frage bereitet Schwierigkeiten, indem die nach der Hydrolyse vorhandene Ammoniakmenge von der Art des Hydrolysierens abhängig ist. Die Angaben differieren daher teilweise recht erheblich. Ohne alle Befunde aufzuzählen, wollen wir nur darauf hinweisen, daß Cohnheim in seiner „Chemie der Eiweißkörper" für 100 g Casein einen Ammoniakgehalt von 1,8 g angibt, während Skraup

[1]) A. C. Andersen, diese Zeitschr. 70, 344, 1915.

und Hardt-Stremayr[1]), sowie Osborne und Harris, Gümbel, Denis[2]) 1,6 g Ammoniak auf 100 g Casein finden. Aus den Versuchen des letztgenannten Forschers ergibt sich, indem der Stickstoffgehalt des Caseins gleichzeitig bestimmt worden ist, daß nach der Hydrolyse 8,5 % des Gesamtstickstoffs als Ammoniak gefunden wurden. Die Aufspaltung geschah durch Kochen mit starken Säuren, Salz- oder Schwefelsäure, in den Versuchen von Denis z. B. durch 7 bis 50stündiges Kochen des Caseins mit der 50fachen Menge von konzentrierter Salzsäure.

Van Slyke[3]) fand etwas höhere Ammoniakwerte. Er kocht das Casein mit 35 Teilen 20%iger Salzsäure und findet nun 8,9 bis 9,4 bis 10,1 % des Gesamtstickstoffs als Ammoniak, je nachdem das Kochen 10 bis 24 oder 48 Stunden dauert, während er bei der Hydrolyse unter Druck in der von Henriques und Gjaldbäk (siehe unten) angegebenen Weise 9,8 % findet. Diese Befunde stimmen mit der Cohnheimschen Angabe gut überein, denn wenn man mit 15,6 % Stickstoff im Casein rechnet, ergeben sich hieraus 9,5 % des Gesamtstickstoffs als Ammoniak.

Gegenüber diesen Angaben stehen einige Versuche von Henriques und Gjaldbäk[4]), sowie alle diejenigen, die während der hier mitgeteilten Untersuchungen von uns ausgeführt wurden. Henriques und Gjaldbäk finden nach 6stündigem Kochen des Caseins mit 20%iger Salzsäure 10,9 %, nach 12stündigem Kochen 11,3 %, und nach $1^1/_2$stündigem Autoklavieren des Caseins mit 3 n-Salzsäure bei 150° 11,9 % des Gesamtstickstoffs als Ammoniak. Zu ganz ähnlichen Resultaten gelangten wir, indem wir beim Kochen des Caseins mit Schwefelsäure (3 g konz. Schwefelsäure und 6 g Wasser auf 1 g Casein) 10 bis 11 %, und beim Autoklavieren unter den angegebenen Verhältnissen etwa 11 bis 12 % fanden.

---

[1]) Zd. H. Skraup und E. v. Hardt-Stremayr, Sitzungsber. d. Wien. Akad., math.-naturw. Klasse, Abt. IIb, **117**, 25, 1908.

[2]) Siehe die Zusammenstellung bei W. Denis, Journ. of Biolog. Chem. **8**, 432, 1910, sowie bei T. B. Osborne und H. H. Guest, ibid. **9**, 348, 1911.

[3]) D. D. Van Slyke, Journ. of Biolog. Chem. **12**, 295, 1912.

[4]) V. Henriques und J. K. Gjaldbäk, Zeitschr. f. physiol. Chem. **67**, 18, 1910; **75**, 393, 1911.

Die meisten der hier erwähnten Untersuchungen wurden mit „Casein nach Hammarsten" ausgeführt. Verschiedene Präparate dieses Körpers differieren gewöhnlich nur sehr wenig untereinander — z. B. war kein sicher wahrnehmbarer Unterschied vorhanden zwischen Präparaten, die mehrere Jahre hindurch von der Firma C. A. F. Kahlbaum, Berlin, bezogen wurden —, und es ist deshalb auffällig, daß so große Unterschiede in den Ammoniakbefunden vorhanden sind. Viele der älteren Angaben sind wohl zu niedrig, weil das Kochen mit Säure zu kurze Zeit dauerte, um alles Ammoniak abzuspalten; wir können erst dann sicher damit rechnen, alles Ammoniak abgespalten zu haben, wenn der zu untersuchende Eiweißkörper völlig hydrolysiert ist, und dies erfordert, wie die neueren Versuche von Henriques und Gjaldbäk (l. c.) sowie von Van Slyke[1]) gezeigt haben, langdauerndes Kochen mit Säure. Bei langdauerndem Kochen und besonders beim Autoklavieren wird aber sicher ein Teil des vorhandenen Ammoniaks sekundär entstanden sein, weshalb die Resultate hier zu hoch sind; nichtdestoweniger müssen wir bis zum völligen Abbau der Eiweißkörper zu kochen fortfahren — dann können wir durch besondere Analysen versuchen, die Größe der sekundären Spaltung festzustellen (siehe unten).

Bei vielen Bestimmungen können die niedrigen Resultate auch von der Abdestillation des Ammoniaks herrühren, indem diese früher gewöhnlich nach Zugabe eines Überschusses von gebrannter Magnesia geschah; bei der Neutralisation des großen Säureüberschusses bildet sich ja viel Magnesiumsalz, wodurch die vollständige Abdestillation des Ammoniaks, wie von Kober[2]) gezeigt, fast unerreichbar wird. Bei vielen der neueren Bestimmungen ist Folins[3]) Durchlüftungsmethode zur Anwendung gelangt, die wohl erheblich besser ist. Am sichersten ist doch wohl die von Henriques und Gjaldbäk sowie von uns benutzte Modifikation der Krüger-Reich-Schittenhelmschen Methode[4]), nach der das Ammoniak nach Zugabe von Barium-

---

[1]) D. D. Van Slyke, l. c.; siehe auch Osborne und Guest, l. c.

[2]) P. A. Kober, Journ. Amer. Chem. Soc. 30, 1279, 1908.

[3]) O. Folin, Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 162, 1903.

[4]) V. Henriques und S. P. L. Sörensen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 137, 1909.

hydroxyd, in Methylalkohol gelöst, im Vakuum bei einer im Wasserbade 40° nicht übersteigenden Temperatur abdestilliert wird.

Das Ammoniak als primäres Spaltprodukt.

Die Hauptmenge des bei der Hydrolyse der Eiweißkörper gebildeten Ammoniaks wird bekanntlich als primäres Spaltprodukt betrachtet, d. h. das Ammoniak findet sich im Eiweißmolekel als Baustein neben den Aminosäuren. Ein Teil des Ammoniaks muß jedoch als sekundäres Spaltprodukt aufgefaßt werden, d. h. es ist durch Zersetzung vorhandener Aminosäuren gebildet. Es ist bekannt, daß einige Aminosäuren durch anhaltendes Kochen mit starken Säuren Ammoniak abspalten, und daraus ergibt sich auch, daß sich, je länger ein Eiweißkörper mit starker Säure gekocht worden ist, um so mehr Ammoniak in der Lösung findet; die Tendenz zur Ammoniakbildung steigt mit der Temperatur und ist daher beim Autoklavieren größer als beim Kochen unter Atmosphärendruck.

Wie oben gesagt, muß bei der Bestimmung der Ammoniakmenge eines Eiweißkörpers derselbe erst vollständig hydrolysiert werden, wobei selbstverständlich die Hydrolyse in solcher Weise auszuführen ist, daß die sekundäre Spaltung möglichst klein wird. Man könnte annehmen, daß die sekundäre Spaltung eben bei der Hydrolyse, d. h. im Augenblicke des Freimachens der Aminosäuren, am größten wäre, daß die Aminosäuren somit beständiger gegen die Einwirkung der starken Säure sind, wenn sie erst gebildet worden sind, als im Augenblicke der Abspaltung. Dies ist aber nicht der Fall, denn wenn ein Eiweißkörper möglichst weit durch die Verdauungsenzyme abgebaut ist und dann mittels Säure vollständig hydrolysiert wird, dann ist die gebildete Ammoniakmenge nicht geringer, sondern vielmehr gewöhnlich etwas größer als bei direkter Säurehydrolyse desselben Eiweißkörpers.

Wenn man damit rechnen könnte, daß nur Aminogruppen — d. h. solche NH_2-Gruppen, die sich formoltitrieren lassen — von der sekundären Spaltung betroffen würden, so wäre die Hydrolyse als vollständig zu betrachten, wenn ein Maximum an Aminogruppen erreicht worden ist. Nun finden sich aber im Eiweißmolekel stickstoffhaltige Gruppen, die keine formoltitrierbare NH_2-Gruppe enthalten, bei deren Zersetzung aber

neben Ammoniak normalreagierende Aminogruppen entstehen können, z. B. die Guanidogruppe des Arginins. Wenn z. B. diese unter Bildung von Ammoniak und Ornithin zerfällt, so haben wir eine sekundäre Spaltung, wodurch sowohl die Menge des Ammoniaks wie auch die des Aminostickstoffs erhöht wird; nach allem was wir über die in den Eiweißkörpern vorhandenen Aminosäuren wissen, erfordern aber derartige eingreifende Spaltungsprozesse eine solche Säurekonzentration und namentlich eine solche Temperatur, daß die durch sekundäre Spaltung verursachte Vermehrung der Aminogruppen gegenüber der gleichzeitig eintretenden Abspaltung von Ammoniak aus im voraus vorhandenen Aminogruppen zurücktreten würde. Eine Vermehrung der Aminogruppen durch sekundäre Spaltungen wird somit aller Wahrscheinlichkeit nach nicht zu befürchten sein, und wir können somit sagen, daß die Hydrolyse derartig auszuführen ist, daß die Menge des Aminostickstoffs ein Maximum erreicht. Infolgedessen wäre die Hydrolyse durch Kochen des Eiweißkörpers mit Säure unter Atmosphärendruck auszuführen; eine vollständige Hydrolyse erfordert aber dann tagelanges Kochen, und trotzdem kann sie in einigen Fällen schwer erreichbar sein. Bei dem $1^1/_2$ stündigen Autoklavieren der Eiweißkörper mit einem Überschuß an 3 n-Salzsäure bei 150° wird eine vollständige Hydrolyse schnell und sicher erreicht, und obschon die sekundäre Spaltung hier etwas, wenn auch nur wenig, größer ist als beim Kochen mit Säure unter Atmosphärendruck, so ist diese Methode doch eben wegen der Schnelligkeit und Sicherheit vorzuziehen. Bei den hier erwähnten Versuchen ist nur diese Methode zur Ausführung der Hydrolyse benutzt worden; nach dem Autoklavieren wurde die Lösung zur Entfernung des Salzsäureüberschusses auf dem Wasserbade möglichst eingedampft.

Bei dieser Behandlung wissen wir, daß die Gesamtmenge des Tryptophans zersetzt wird, denn die Lösung ergibt keine Tryptophanreaktion mehr. Welche die Zersetzungsprodukte sind, wissen wir nicht sicher, es wurde aber der folgende Versuch ausgeführt, um zu untersuchen, ob die Zersetzung mit einer Ammoniakentwicklung verbunden ist.

Versuch.

0,3 bis 0,4 g Tryptophan wurden in etwa 17 ccm Wasser gelöst. 5 ccm dienten zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs gleich 13,80 mg. 10 ccm + 3 ccm konz. Salzsäure wurden autoklaviert, die Lösung auf dem Wasserbade bis zur Trockne verdampft, der Rest in Wasser gelöst und zur Ammoniakbestimmung benutzt; nur 0,15 mg N waren als Ammoniak vorhanden.

Der ammoniakfreie Rest wurde in Salzsäure gelöst und mit Wasser bis auf 20 ccm verdünnt. 10 ccm dienten zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs gleich 13,70 mg N. 5 ccm wurden im Van Slykeschen Apparate zur Bestimmung der Aminogruppen untersucht; 53,7 % des Stickstoffs reagierten mit der salpetrigen Säure. Der Rest wurde zum Anstellen der Glyoxylsäurereaktion benutzt; es zeigte sich eine rein blaue Farbe, ganz verschieden von der gewöhnlichen violetten.

Es zeigt sich somit, daß das Tryptophan, jedenfalls wenn es rein ist, beim Autoklavieren mit Salzsäure unter den erwähnten Bedingungen nicht unter Abspaltung von Ammoniak zerfällt; auch wird kein neuer Aminostickstoff gebildet.

Es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß die Hauptmenge des Cystins unter Abspaltung von Ammoniak zerfällt[1]); die Menge des Cystins ist jedoch gewöhnlich sehr klein. Soweit bekannt, erleiden die übrigen Aminosäuren dagegen nur sehr geringfügige Spaltungen. Um etwas über die Größe der sekundären Spaltung zu erfahren, wurde der folgende Versuch ausgeführt.

Versuch.

10 g Casein wurden in 300 ccm 3n-Salzsäure auf dem Wasserbade gelöst, und die Lösung wurde in der angegebenen Weise autoklaviert. Nach dem Erkalten wurden etwa 30 ccm herausgenommen (Probe I). Die restierende Lösung wurde wieder autoklaviert, und nachdem eine zweite Probe (Probe II) entnommen war, wurde die übriggebliebene Lösung nochmals in derselben Weise behandelt; hieraus Probe III.

Die drei Proben wurden in derselben Weise behandelt. Nachdem sie auf dem Wasserbade bis zur Trockne eingedampft worden waren, wurden die Reste in Wasser gelöst und bis auf 50 ccm mit Wasser verdünnt. 5 ccm jeder Lösung dienten zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs, während 40 ccm in Kolben gebracht, mit methylalkoholischer Barytlösung in Überschuß (Überschuß 5 bis 10 ccm ca. 1n-Lösung) versetzt und im Vakuum bei einer im Wasserbade 40° nicht übersteigenden

---

[1]) Vgl. K. A. H. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 354, 365, 1904. — E. Friedmann und J. Baer, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 8, 330, 1906. — V. Henriques und J. K. Gjaldbäk, Zeitschr. physiol. Chem. 67, 25, 1910, Anm.

Temperatur zur Trockne destilliert wurden. Das abdestillierende Ammoniak wurde wie gewöhnlich in Schwefelsäure aufgefangen und nachher bestimmt, während der Destillationsrest in der eben notwendigen Salzsäuremenge gelöst und bis auf 100 ccm verdünnt wurde. Diese Lösungen dienten dann zur Bestimmung der Menge des Aminosäurestickstoffs nach Van Slyke, und zwar unter 6- wie auch 30 minutenlanger Einwirkung der salpetrigen Säure, um allen Stickstoff zur Reaktion zu bringen. Die Resultate waren:

	In Prozent des Gesamtstickstoffs		
	Ammoniak-N	Aminosäure-N	
		Während 6 Min.	30 Min.
Probe I	11,38	69,8	72,9
„ II	12,22	69,3	72,1
„ III	13,11	68,2	71,1

Die Vermehrung der Ammoniakmenge beträgt somit bei wiederholtem Autoklavieren 0,84 bzw. 0,89% des Gesamtstickstoffs, was sehr nahezu der Verminderung des Aminosäurestickstoffs entspricht. Die hier erfolgte sekundäre Spaltung scheint sich somit ausschließlich auf schon vorhandene Aminogruppen zu beziehen. Die Resultate lassen sich natürlich nicht mit absoluter Sicherheit auf das erste, die Hydrolyse bewirkende, Autoklavieren übertragen; wir werden jedoch wohl keinen großen Fehler begehen, wenn wir schließen, daß die sekundäre Spaltung hier von ungefähr derselben Größe ist und daß somit die Ammoniakmenge des Caseins etwa 10,5% des Gesamtstickstoffs entspricht.

Wie ist das Ammoniak im Eiweißmolekel gebunden?

Es wird, wie bekannt, gewöhnlich angenommen, daß das Ammoniak an die eine Carboxylgruppe der Asparagin- oder Glutaminsäure gebunden ist, daß also in den Eiweißkörpern nicht Asparaginsäure und Glutaminsäure, sondern Asparagin und Glutamin vorhanden sind. Diese Annahme wird durch die Untersuchungen von Osborne, Leavenworth und Brautlecht[1]) gestützt, die für viele Eiweißkörper die nach dem Kochen mit Salzsäure vorhandene Ammoniakmenge mit der Menge verglichen haben, die aus den vorhandenen Asparagin- und Glutaminsäuremengen unter der erwähnten Voraussetzung berechnet werden kann, und gute Übereinstimmung gefunden haben; bald wurde mehr, bald weniger als die berechnete

[1]) T. B. Osborne, C. S. Leavenworth und C. A. Brautlecht, Amer. Journ. of Physiol. 23, 180, 1908.

Ammoniakmenge gefunden. Zwar müssen wir uns erinnern, daß die beiden Aminosäuren nicht genau bestimmt werden können, da aber die Menge der Asparaginsäure gewöhnlich gegenüber der Glutaminsäuremenge sehr klein ist und eben die Glutaminsäure wegen der Schwerlöslichkeit des Chlorhydrats dieser Säure in konz. Salzsäure recht genau bestimmt werden kann, ist es zweifelhaft, ob die Fehler in den Bestimmungen dieser beiden Aminosäuren in der hier erwähnten Beziehung von Bedeutung sind.

Gesetzt also, daß die Annahme richtig ist; es finden sich die Monoaminodicarbonsäuren als Amide — als Asparagin und Glutamin — im Eiweißmolekel. Diese beiden Körper reagieren neutral, und die übrigen bekannten Aminosäuren sind entweder neutralreagierende Monoaminomonocarbonsäuren oder basisch reagierende Aminosäuren wie Lysin, Arginin und Histidin. Ein Gemisch dieser Körper muß basisch reagieren, denn die Carboxylgruppen sind den vorhandenen α-Aminogruppen äquivalent, und die ε-Aminogruppe des Lysins, die Guanidogruppe des Arginins und die Imidazolgruppe des Histidins sind frei. Wenn sämtliche Aminosäuren miteinander peptidartig verbunden werden, dann müssen auch basisch reagierende Molekeln resultieren; die meisten Eiweißkörper sind aber neutral oder schwach sauer, was somit nicht mit der Theorie im Einklang ist.

Nun ist es ja eine gewöhnliche Annahme, daß nicht alle Bindungen, die die einzelnen Bestandteile der Eiweißkörper vereinigen, Peptidbindungen sind. Um zu neutralreagierenden Aminosäurekomplexen zu kommen, kann man dann entweder annehmen, daß einige Bindungen vorkommen, bei denen mehr basische als saure Gruppen verschwunden sind, oder auch, daß stickstofffreie Säuren neben den Aminosäuren vorkommen. Wie man sich im ersten Falle die Bindungen vorstellen soll, muß dahingestellt bleiben; gibt es Bindungen dieser Art, so muß ein neutraler Körper bei Hydrolyse eine basisch reagierende Aminosäuremischung ergeben, was bei der Verdauung mittels Trypsin und Erepsin bemerkbar sein müßte. Verschiedene Eiweißkörper, wie Fleisch, Casein, Eieralbumin, werden aber ohne nennenswerte bleibende Reaktionsänderung der Lösung abgebaut. Wir glauben deshalb nicht an die Existenz derartiger Bindungen im Eiweißmolekel. Die zweite Annahme, daß stickstofffreie

Säuren neben den Aminosäuren vorhanden sind, ist auch nicht wahrscheinlich, denn bei den vielen Untersuchungen, die über die Zusammensetzung der Eiweißkörper angestellt worden sind, haben sich solche Säuren unseres Wissens nie isolieren lassen, mit Ausnahme der Kohlensäure [1]) und der nur in sehr kleinen Mengen vorhandenen Methylsulfonsäure [2]), sowie der nur in wenigen Eiweißkörpern vorkommenden Phosphorsäure. Bei dem folgenden Versuch konnten wir feststellen, daß neben Kohlensäure keine flüchtigen oder in Äther löslichen stickstofffreien Säuren in nennenswerter Menge vorhanden waren.

Versuch.

500 ccm einer Caseinlösung, die durch monatelange Verdauung mit Pepsin, Pankreatin und Darmpreßsaft hergestellt und möglichst abgebaut war, wurden mit 200 ccm gesättigtem Barytwasser versetzt und vom Bariumcarbonat und Bariumphosphat filtriert. Das Filtrat wurde mit überschüssiger Schwefelsäure versetzt; vom Bariumsulfat wurde abfiltriert.

450 ccm des Filtrates (= 1500 mg Stickstoff) wurden dann mit 150 g konz. Schwefelsäure versetzt und 12 Stunden mit Rückflußkühler über freier Flamme gekocht. Der Rückflußkühler war oben mit einer Barytwasser enthaltenden Peligot-Röhre versehen, und es zeigte sich hierdurch, daß während des Kochens reichlich Kohlensäure entwich. Nach beendigtem Kochen wurde 1 l Wasser zugefügt, um dann wieder abdestilliert zu werden.

Das Destillat reagierte nicht sauer auf Lackmuspapier. Es wurde mit Phenolphthalein versetzt und mit $^{n}/_{5}$-Natronlauge titriert, wovon 4 ccm notwendig waren, um bleibende rote Farbe hervorzubringen. Da sicher Kohlensäure vorhanden war — teils von zugesetztem Wasser, teils von der Lösung selbst herrührend — ist es sehr zweifelhaft, ob andere Säuren vorhanden sind; wenn flüchtige organische Säuren wirklich vorhanden sein sollten, ist die Menge jedoch durchaus klein und hier ohne Bedeutung.

Der schwefelsäurehaltige Destillationsrest wurde 3 mal mit je 1 l Äther kräftig durchgeschüttelt; der Äther wurde abgetrennt und mit 2×25 ccm Wasser gewaschen. Die gesammelten Ätherauszüge wurden dann mit Wasser geschüttelt, dem so viel Barytwasser zugesetzt wurde, daß es auch nach dem Schütteln stark basisch reagierte. Nachdem die wäßrige Lösung abgetrennt und der Äther 2 mal mit Wasser nachgewaschen worden war, wurde die wäßrige Lösung mit Kohlensäure gesättigt, im Vakuum bis auf 50 bis 100 ccm eingeengt und vom ausgefallenen Bariumcarbonat filtriert; es wurde mit kohlensäurefreiem Wasser nachgewaschen, bis das Filtrat ein Volumen von 100 ccm hatte.

---

[1]) F. Lippich, Zeitschr. f. physiol. Chem. **90**, 441, 1914.

[2]) C. T. Mörner, Zeitschr. f. physiol. Chem. **93**, 175, 1914.

In der Lösung wurde die Barytmenge in gewöhnlicher Weise bestimmt; es wurde 0,0800 g Bariumsulfat gefunden. Das Filtrat war stickstofffrei.

Da das Bariumcarbonat bei weitem nicht in reinem Wasser unlöslich ist [1]), wurde der folgende Kontrollversuch ausgeführt. 500 ccm Wasser + 10 ccm gesättigtes Barytwasser wurden mit Kohlensäure gesättigt und dann eingeengt und filtriert wie oben. Da in der Lösung nur kohlensaurer Baryt vorhanden sein kann, wurde die Barytbestimmung aber in folgender Weise ausgeführt. Die wäßrige Lösung wurde mit 5 ccm $^n/_5$-Salzsäure und mit mehr Wasser versetzt und dann durch Kochen von Kohlensäure befreit, abgekühlt und zurücktitriert, wobei 4,65 ccm $^n/_5$-Natronlauge notwendig waren. Die Barytmenge entspricht somit nur 0,35 ccm $^n/_5$-Salzsäure, während die im Hauptversuch gefundene Bariumsulfatmenge 3,43 ccm $^n/_5$-Lösung entspricht. Es war dann wirklich ätherlösliche Säure vorhanden, aber nur in solcher Menge, daß sie leicht durch die oben erwähnte sekundäre Ammoniakabspaltung aus den Aminosäuren entstanden sein kann.

Die Annahme von dem Vorhandensein der gesamten Ammoniakmenge als den vorhandenen Monoaminodicarbonsäuren äquivalent und mit diesen verbunden, ist somit nicht gut mit den Eigenschaften der Eiweißkörper vereinbar. Wir werden versuchen, eine andere Erklärung der Bindung des Ammoniaks zu geben.

Im Jahre 1908 machten Skraup und Hardt-Stremayr [2]) darauf aufmerksam, daß schon bei kürzerer Einwirkung konzentrierter und auch verdünnter Säuren, im ersteren Falle schon nach 5 Minuten rund zwei Drittel und darüber des als Ammoniak vorhandenen Stickstoffs aus dem Eiweißmolekel getreten sind, während das letzte Drittel erst später und zwar nach und nach frei wird. Daß der letzte Teil des Ammoniaks nur langsam abgespalten wird, ist später oft hervorgehoben worden; so hat z. B. Denis [3]) bemerkt, daß die Ammoniakmenge ansteigt, bis die Biuretreaktion der Lösung verschwunden ist; überhaupt wird die Ammoniakmenge erst dann einigermaßen konstant, wenn die Hydrolyse des Eiweißes beendigt oder nahezu beendigt ist. Nun ist es ja bekannt, daß Asparagin und Glutamin durch Kochen mit Säuren sehr leicht gespalten werden,

---

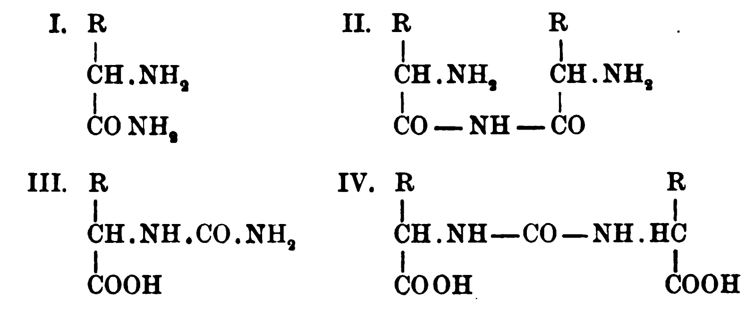
[1]) S. P. L. Sörensen und A. C. Andersen, Zeitschr. f. anal. Chem. **44**, 163, 1904.

[2]) Zd. H. Skraup und E. v. Hardt-Stremayr, Sitzungsber. der Wiener Akad. d. Wissensch., math.-naturw. Kl., Abt. IIb, **117**, 25, 1908.

[3]) W. Denis, Journ. of biol. Chem. **8**, 432, 1910.

und auch das hier Erwähnte könnte dann darauf hindeuten, daß wohl ein Teil des Ammoniaks aus Glutamin bzw. Asparagin abgespalten wird, daß dagegen ein anderer Teil in anderer, schwerer spaltbarer Bindung vorkommt. Welche ist nun diese Bindung?

Nach den Untersuchungen der letzten Jahre wissen wir, daß aus Ammoniak und Aminosäuren Verbindungen von folgenden Typen entstehen können:



Verbindungen der ersten Form sind die gewöhnlichen Aminosäureamide, wie Asparagin und Glutamin, sowie die synthetisch hergestellten Amide der Monoaminomonocarbonsäuren. Von dem Vorhandensein des Ammoniaks in dieser Bindung ist ja oben gesprochen.

Verbindungen der zweiten Form sind von Bergell und Feigl[1]) synthetisch hergestellt worden. Nach den Eigenschaften derartiger Verbindungen darf auf die Abwesenheit derselben im Eiweißmolekel geschlossen werden, denn sie scheinen zu widerstandsfähig gegenüber Säuren zu sein, so wird z. B. das Diglycinimid ($NH_2.CH_2.CO—NH—CO.CH_2.NH_2$) durch 12stündige Einwirkung von 20 Teilen konz. Salzsäure bei 125° überhaupt nicht gespalten. Außerdem sind, wie oben erwähnt, mit der Annahme, daß 1 Mol. Ammoniak 1 Carboxylgruppe bindet, schon zu wenig Carboxylgruppen im Eiweißmolekel, um ein neutrales Molekel entstehen zu lassen, geschweige denn, wenn 1 Mol. Ammoniak 2 Carboxylgruppen bindet.

Verbindungen der dritten Form, die Uraminosäuren, sind in den letzten Jahren von Lippich hergestellt und studiert

[1]) P. Bergell, Zeitschr. f. physiol. Chem. 51, 207, 1907; P. Bergell und J. Feigl, ibid. 54, 258, 1907; 55, 173, 1908.

worden [1]). Gleichzeitig hat er versucht, solche Säuren in den Eiweißkörpern nachzuweisen; dies ist ihm aber nicht gelungen; dagegen hat er nachgewiesen, daß die verschiedenartigsten Eiweißkörper durch Kochen mit Säuren wie auch mit Alkalien außer Ammoniak noch Kohlensäure abspalten; er meint hieraus schließen zu dürfen, daß im Eiweißmolekel Uraminosäuren vorhanden sind, wenn er auch zugibt, daß er keinen zwingenden Beweis habe erbringen können.

Einen endgültigen Beweis für die Existenz dieser Säuren im Eiweißmolekel haben auch wir nicht liefern können, denn dies erfordert ja die Isolierung einer oder mehrerer Uraminosäuren aus den Eiweißspaltprodukten, was noch nicht gelungen ist. Wir werden jedoch verschiedene Verhältnisse hervorheben, die das Vorkommen dieser Säuren wahrscheinlich machen. Ehe wir dazu übergehen, seien ein paar Worte über die Verbindungen der 4. Form vorausgeschickt.

Solche Verbindungen sind von Hugounenq und Morel [2]) hergestellt worden. Die Autoren sagen nichts über das Verhalten dieser Körper gegen Alkalien und Säuren, dagegen bemerken sie, daß sie bei der Behandlung dieser Säuren mit Verdauungsenzymen keine Wirkung wahrnehmen konnten, die auf Spaltungen der Körper durch die genannten Enzyme hindeuteten. Wenn sie dies auch nicht als einen zwingenden Beweis gegen Schützenbergers alte Annahme vom Vorhandensein der Harnstoffgruppe im Eiweißmolekel auffassen, so meinen sie doch, daß es gegen diese Annahme spricht. Was im folgenden entwickelt werden soll, wird in mancher Hinsicht auch auf die erwähnten Diureide passen; ob diese oder die Uraminosäuren Lippichs vorliegen, wird wohl erst dann entschieden werden können, wenn es gelingt, die betreffenden Körper zu isolieren.

Die Uraminosäuren haben den neutralen Charakter der Aminosäuren verloren und sind vielmehr recht starke Säuren. Durch diese Art der Bindung des Ammoniaks können somit im Eiweißmolekel überschüssige Aminogruppen neutralisiert

---

[1]) F. Lippich, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **39**, 2953, 1906; **41**, 2953, 2974, 1908; Zeitschr. f. physiol. Chem. **68**, 278, 1910; **90**, 124, 145, 441, 1914.

[2]) L. Hugounenq u. St. Morel, Compt. rend. **140**, 859, 1905; **143**, 119, 1906.

werden, d. h. wenn diese Bindung im Eiweißmolekel vorkommt, dann können wir auch unter der Voraussetzung, daß mehr Ammoniak vorhanden ist, als der einen Carboxylgruppe der Dicarbonsäuren äquivalent ist, zu neutral oder gar sauer reagierenden Eiweißmolekeln kommen. Diese Säuren sind ja Ureide, und es ist wohl dann wahrscheinlich, daß sie ebensowenig wie der Harnstoff durch die Verdauungsenzyme zerlegt werden; es besteht somit die Möglichkeit, daß die in vitro unvollständige Verdauung der Eiweißkörper eben auf das Vorhandensein dieser Gruppe zurückzuführen ist. Mit dieser Annahme stimmt es auch, daß die durch Enzyme möglichst weit abgebauten Eiweißkörper durch Behandlung mit Säure neben Aminogruppen reichlich Ammoniak liefern[1]), und zwar spricht dies für das Vorhandensein der Uraminosäuren und nicht der Diureide, denn diese sollten nur Aminogruppen, aber kein Ammoniak liefern können.

Es fragt sich nun zuerst, inwiefern die Uraminosäuren wirklich den Verdauungsenzymen gegenüber resistent sind. Aus dem Verhalten einer einzelnen Säure oder ein paar Säuren lassen sich keine sicheren Schlüsse ziehen, denn es kann zwischen einzelnen Säuren ein ähnlicher Unterschied vorhanden sein wie z. B. zwischen Leucinamid, das leicht durch Pankreassaft abgebaut wird, und Asparagin, Glycinamid und Alaninamid, die nicht abgebaut werden, oder jedenfalls sehr resistent sind[2]). Man muß daher entweder die Uraminosäuren sämtlicher Aminosäuren je für sich untersuchen, oder auch, wie wir es getan haben, eine Mischung der verschiedenen Säuren als Versuchsobjekt benutzen.

Versuch.

50 g Casein nach Hammarsten wurden in 1 l 3n-Salzsäure auf dem Wasserbade gelöst, die Lösung $1^1/_2$ Stunden auf 150° im Autoklaven erhitzt und dann zur Trockne auf dem Wasserbade eingedampft, der Rest mit Wasser bis auf 1 l gelöst. Diese Lösung wurde mit Bleicarbonat auf dem Wasserbade erwärmt, bis sie neutral reagierte, und bis zum nächsten Tag hingestellt; dann wurde abfiltriert und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat war fast farblos; es wurde mit Schwefelwasser-

---

[1]) A. C. Andersen, diese Zeitschr. 70, 344, 1915.

[2]) P. Bergell u. H. v. Wülfing, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64. 348, 1910.

stoff entbleit und filtriert, und nachdem es durch Eindampfen im Vakuum vom Schwefelwasserstoff befreit worden war, wurde überschüssiges Barytwasser zugesetzt und das Ammoniak im Vakuum abgedampft. Die Lösung wurde dann mit Kohlensäure gesättigt und vom Bariumcarbonat abfiltriert; eine Stickstoffbestimmung zeigte, daß 3,75 g Stickstoff im Filtrat vorhanden waren.

Die auf 250 bis 300 ccm im Vakuum eingedampfte Lösung wurde mit 75 g Harnstoff versetzt und 10 Stunden in siedendem Wasserbade erhitzt. Nachdem dann überschüssiges Barytwasser zugesetzt worden war, wurde die Lösung durch Einengen im Vakuum vom Ammoniak und dann mittels Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit und schließlich im Vakuum eingedampft. Nach dem Eindampfen bis auf etwa 75 ccm wurde die Lösung unter starkem Umrühren in 1600 ccm abs. Alkohol eingetröpfelt, und 2 Tage später wurden die ausgefallenen Bariumsalze abfiltriert, mit abs. Alkohol gewaschen und in Wasser gelöst. Die Lösung wurde auf etwa 50 ccm im Vakuum eingedampft und in 1 l abs. Alkohol eingetröpfelt; die Bariumsalze bildeten dann nach dem Abfiltrieren, Waschen und Trocknen ein weißgraues, staubfeines Pulver.

Die Bariumsalze wurden in etwa 2 l Wasser gelöst und mit einem sehr deutlichen Überschuß von Schwefelsäure versetzt; nachdem vom Bariumsulfat abfiltriert worden war, wurde die Lösung im Vakuum eingeengt, wo ein wenig Bariumsulfat abfiltriert und auf 1 l verdünnt; sie enthielt 6,03 g Stickstoff.

5 ccm der Lösung wurden mit $^{n}/_{5}$-Natronlauge gegenüber empfindlichem Lackmuspapier genau neutralisiert, wozu 6,50 ccm Natronlauge notwendig waren. Wurden noch 0,2 ccm Lauge, sowie etwas Phenolphthalein hinzugefügt, dann färbte sich die Lösung deutlich rot; nach dem Zusatz von neutralem Formol war die Lösung farblos, mit 0,1 ccm Natronlauge wurde sie aber wieder rot; mit noch 0,1 ccm Lauge war die Farbe der Kontrollösung erreicht. Die formoltitrierbare Stickstoffmenge entspricht somit 0,4 ccm $^{n}/_{5}$-Natronlauge = 1,12 mg Stickstoff = 3,7 % des Gesamtstickstoffs.

a) 100 ccm der Lösung + 0,5 g Pepsin b) 100 ccm " " + 10 ccm ca. 2n-Natronlauge + 32 ccm $^{n}/_{5}$-Natronlauge + 1 g Pankreatin + 5 ccm Darmpreßsaft + etwas Toluol (die Reaktion schwach basisch auf Lackmus-, nicht aber auf Curcumapapier)	wurden bei 37° in den Thermostaten gestellt, es bildete sich aber während 1 Monat nicht soviel Ammoniak, daß eine Spaltung sichergestellt werden konnte.

Es hat sich somit hieraus nichts ergeben, das gegen die Annahme spricht, daß die Aminosäurekomplexe, die durch die Verdauungsenzyme nicht gespalten werden, Ureide enthalten.

Von Kossel und Gawrilow[1]) ist gezeigt worden, daß die

[1]) A. Kossel u. N. Gawrilow, Zeitschr. f. physiol. Chem. 81, 274, 1913.

Eiweißkörper, die kein oder nur wenig Lysin enthalten, kaum oder nur in geringem Grade mit Formaldehyd im Sinne der Formoltitrierung reagieren, während die Eiweißkörper, die reichlich Lysin enthalten, auch reichlich formoltitrierbaren Stickstoff besitzen; sie meinen deshalb, daß die eine Aminogruppe des Lysins in den Eiweißkörpern nicht „peptidgebunden", sondern frei ist. Da die Uraminosäuren keinen formoltitrierbaren Stickstoff enthalten (siehe oben), muß hieraus gefolgert werden, daß die nichtpeptidgebundene Aminogruppe des Lysins auch nicht durch Ureidbildung neutralisiert ist, sondern wirklich frei vorkommt.

Daß die eine Aminogruppe des Lysins, und zwar die ε-Gruppe, in den Eiweißkörpern frei vorkommt, ist auch durch Untersuchungen mit der Van-Slykeschen Methode nachgewiesen worden[1]). Es hat sich für verschiedene Eiweißkörper eine gute Übereinstimmung ergeben zwischen der Menge des Aminostickstoffs, die gefunden wird, und derjenigen, die aus der Lysinmenge unter der angegebenen Voraussetzung berechnet werden kann. Bei einigen Eiweißkörpern ergibt sich aber mehr als berechnet; der entwickelte Stickstoff wird somit auch aus anderen Gruppen gebildet.

Es muß im voraus als wahrscheinlich betrachtet werden, daß die Uraminosäuren wie der Harnstoff langsam und sehr unvollständig mit salpetriger Säure reagieren. Ein Versuch bestätigt auch diese Annahme.

Versuch.

Zur Verwendung kam eine Uraminosäurelösung wie die oben erwähnte; 2,7% des Stickstoffs konnten formoltitriert werden. Bei 20° reagierten während 6 Minuten 14,4% des Gesamtstickstoffs
„ 12 „ 23,1% „ „
„ 30 „ 44,7% „ „

Wenn die Annahme richtig ist, daß die ε-Aminogruppe des Lysins sich im Eiweißmolekel frei befindet, und daß $-NH \cdot CO \cdot NH_2$-Gruppen vorhanden sind, dann soll somit mehr Stickstoff mit salpetriger Säure reagieren, als der Hälfte des Lysinstickstoffs entsprechend, was auch bei mehreren Eiweißkörpern tatsächlich der Fall ist. Übrigens ist es schwer

[1]) D. D. Van Slyke u. F. J. Birchard, Journ. of. biol. Chem. 16, 539, 1913.

zu entscheiden, ob die reagierende Stickstoffmenge der Hälfte des Lysinstickstoffs entspricht oder nicht, denn wenn komplizierter gebaute Körper vorhanden sind, ist die Methode durchaus unsicher. Das Verhalten gegenüber salpetriger Säure kann deshalb nicht als Beweis für das Vorhandensein der Uraminogruppen dienen; hervorzuheben ist aber, daß sich hier nichts herausgestellt hat, das gegen das Vorhandensein der erwähnten Gruppen spricht.

Wenn auch durch Lippichs Versuche bewiesen worden ist, daß die Eiweißkörper beim Kochen mit Säuren oder Alkalien Kohlensäure abspalten, so braucht doch die Kohlensäure nicht als Säure im Eiweißmolekel enthalten zu sein, vielmehr kann sie durch Einwirkung der Säuren auf irgendwelche Komplexe, z. B. auf die kohlehydratähnliche Gruppe des Eiweißmolekels, sekundär hervorgegangen sein. Daß sie aber wirklich als Säure vorhanden ist, meinen wir durch die folgenden Versuche bewiesen zu haben.

Bei der ersten Methode zur Bestimmung des peptidgebundenen Stickstoffs in genuinen oder teilweise gespaltenen Eiweißkörpern verfuhr S. P. L. Sörensen[1]) in der folgenden Weise.

Von der zu untersuchenden Substanz wurde eine schwach salzsaure Lösung hergestellt, die in zwei gleiche Teile geteilt wurde. Die eine Hälfte wurde mittels starker Salzsäure vollständig hydrolysiert, von dem größten Teil der Salzsäure durch Eindampfen befreit und mit Wasser auf das Anfangsvolumen gebracht. Gleiche Teile der beiden Lösungen wurden dann mit Formol versetzt und titriert. Die Aciditätszunahme kann teils von neuen Carboxylgruppen (gelösten Peptidbindungen), teils von Vermehrung der Salzsäure herrühren. Die Vermehrung der Salzsäure läßt sich aus der Differenz des Chlorgehaltes feststellen, und es kann somit die Vermehrung der Carboxylgruppen leicht berechnet werden. Unter der Voraussetzung, daß keine flüchtigen Säuren (mit Ausnahme der Salzsäure) vorhanden waren, ergibt sich hieraus leicht die Menge des peptidgebundenen Stickstoffs.

Später ist die Methode in der Weise abgeändert worden,

---

[1]) Das Verfahren ist von V. Henriques in Zeitschr. f. physiol. Chem. **54**, 408, 1908 mitgeteilt worden.

daß die Chlorbestimmungen weggefallen sind. Die beiden Lösungen werden nach dieser Methode gegenüber empfindlichem Lackmuspapier[1]) genau neutral gemacht, mit überschüssigem Formol versetzt und wie früher titriert. Es wird eigentlich nach dieser Methode nicht die Vermehrung der Carboxylgruppen, sondern die der Aminogruppen + des Ammoniaks bestimmt, denn vor dem Zusatz des Formols sind sämtliche basische Atomgruppen durch irgendwelche Säuren neutralisiert, und es ergibt sich nicht, ob es Carboxylgruppen sind oder z. B. Salzsäure. Die beiden Methoden werden nur dann die gleiche Menge peptidgebundenen Stickstoffs in irgendeinem Präparat angeben, wenn bei der Hydrolyse eben nur Peptidbindungen gelöst werden — d. h. wenn Aminogruppen und Carboxylgruppen in gleicher Menge frei werden — und die Spaltprodukte sich weder weiter zersetzen noch verflüchtigen. Entstehen bei der Hydrolyse mehr saure als basische Gruppen — was aber nach dem oben Angeführten unwahrscheinlich ist — und bleiben die gebildeten Säuren in der Lösung auch beim Eindampfen, dann muß die erste Methode mehr peptidgebundenen Stickstoff ergeben als die letzte. Wenn umgekehrt mehr basische als saure Gruppen bei der Hydrolyse entstehen, oder wenn ein Teil der gebildeten Säuren sich beim Einengen verflüchtigt, dann muß die letzte Methode mehr peptidgebundenen Stickstoff als die erste ergeben.

Nach allem, was wir wissen, ist die Kohlensäure die einzige flüchtige Säure, die bei der Hydrolyse der Eiweißkörper entsteht. Unter der Voraussetzung, daß bei der Hydrolyse gleich viel saure und basische Gruppen in Freiheit gesetzt werden — d. h. nur Peptid- oder Amidbindungen gelöst werden —, können wir nun folgende Betrachtung anstellen. Entsteht bei der Hydrolyse Kohlensäure, und war diese Kohlensäure im Eiweißmolekel als Säure vorhanden — entweder als Kohlensäure oder als irgendeine organische Säure, die unter Kohlensäureabspaltung zerlegt wird —, dann muß somit die letzte Methode die größte Menge peptidgebundenen Stickstoffs ergeben; dagegen müssen die beiden Methoden dasselbe

[1]) V. Henriques u. S. P. L. Sörensen, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 133, 1909, Anm. unten.

Resultat ergeben, wenn die Kohlensäure in anderer Weise (z. B. aus Kohlenhydraten) gebildet wird.

Der Versuch wurde dann in folgender Weise angestellt:

Versuch.

200 ccm der früher erwähnten, durch Enzyme stark abgebauten Caseinlösung wurden mit Salzsäure bis zur eben sichtbaren sauren Reaktion auf Kongopapier versetzt und durch Erhitzen auf etwa 30° im Vakuum (bis zum Sieden) von Kohlensäure befreit.

9,88% des Stickstoffs waren als Ammoniak vorhanden.

10 ccm der Lösung enthielten Chlor, 18,10 ccm $^{n}/_{10}$-Silbernitratlösung entsprechend.

10 ccm erforderten zur Neutralisation gegen empfindliches Lackmuspapier 4,65 ccm $^{n}/_{5}$-Natronlauge und danach bei der Titrierung in gewöhnlicher Weise nach Zugabe von Formol 10,75 ccm $^{n}/_{5}$-Natronlauge, im ganzen somit 15,40 ccm.

100 ccm wurden mit 33 ccm konz. Salzsäure, $1^{1}/_{2}$ Stunde auf 150° erhitzt, auf dem Wasserbade möglichst eingeengt und mit Wasser bis auf 100 ccm verdünnt. 13,84% des Stickstoffs waren als Ammoniak vorhanden.

10 ccm enthielten Chlor, 40,60 ccm $^{n}/_{10}$-Silbernitratlösung entsprechend.

10 ccm erforderten 15,25 ccm $^{n}/_{5}$-Natronlauge zur Neutralisation gegen empfindliches Lackmuspapier und danach bei der Titrierung in gewöhnlicher Weise nach Zugabe von Formol 12,65 ccm $^{n}/_{5}$-Natronlauge, im ganzen somit 27,90 ccm.

Die Vermehrung der Acidität nach Zugabe von Formol entspricht somit 27,90 ∸ 15,40 = 12,50 ccm $^{n}/_{5}$-Natronlauge, wovon aber 11,25 auf die Vermehrung der Salzsäure kommen; werden diese in Abzug gebracht, resultiert eine Aciditätserhöhung gleich 1,25 ccm $^{n}/_{5}$-Lauge, was 3,5 mg Stickstoff entspricht. Da 10 ccm der Lösung 41,00 mg Stickstoff enthalten, entsprechen 3,5 mg Stickstoff 8,5% des Gesamtstickstoffs.

Nach der neuen Methode ergibt sich aber eine Vermehrung des formoltitrierbaren Stickstoffs gleich 1,90 ccm $^{n}/_{5}$-Natronlauge, was 5,32 mg Stickstoff oder 13,0% des Gesamtstickstoffs entspricht.

Der Versuch hat somit nach der neuen Methode ein um 4,5% des Gesamtstickstoffs höheres Resultat für peptidgebundenen Stickstoff ergeben als nach der alten Methode, d. h. die Kohlensäure war als Säure vorhanden. Auch dies stimmt somit gut mit dem Vorhandensein von Uraminosäuren überein.

Es wäre möglich, daß der hier erwähnte Unterschied größer sein würde, wenn weniger stark abgebaute Eiweißkörper zur Untersuchung gelangten. Daß dies jedoch nicht der Fall ist, ergibt sich aus dem folgenden Versuch.

Versuch.

10 g Casein „Hammarsten" wurden in 100 ccm Wasser verrührt, mit so viel 2n-Natronlauge versetzt, daß die entstandene dickflüssige Lösung ganz schwach alkalisch auf Lackmuspapier reagierte, dann mit 0,25 g Pankreatin „Rhenania" und Toluol versetzt und 24 Stunden im Thermostaten verdaut. Nach Zugabe von 10 ccm 2n-Baryumchloridlösung + 50 ccm gesättigtem Barytwasser wurde filtriert, das Filtrat mit Salzsäure sehr deutlich sauer gemacht und auf 250 ccm verdünnt. Die Untersuchung gestaltete sich dann genau wie im vorigen Versuch.

Das Ammoniak stieg von 1,26 bis auf 11,44 % des Gesamtstickstoffs bei der Säurespaltung.

Nach der neuen Methode ergaben sich 47,1 %, nach der alten dagegen nur 42,3 % des Gesamtstickstoffs als peptidgebunden. Der Unterschied beträgt somit 4,8 % des Gesamtstickstoffs, d. h. er ist von derselben Größe wie nach möglichst weitem Abbau durch Enzyme.

Wenn die Kohlensäureabspaltung auf Uraminosäuren zurückgeführt werden kann, ergibt sich somit hieraus, daß diese nicht durch die Verdauungsenzyme abgebaut worden sind, was auch mit dem oben erwähnten Verhalten dieser Säuren gegenüber Pepsin, Pankreatin und Darmpreßsaft übereinstimmt.

Es muß noch erwähnt werden, daß es in ähnlicher Weise, wie oben für das Ammoniak beschrieben, auch untersucht wurde, ob wiederholtes Autoklavieren derselben Lösung mit einer ständigen Kohlensäureabgabe verbunden ist, d. h. ob die Aminosäuren bei dem Erhitzen auf 150° mit 3n-Salzsäure neben Ammoniak auch Kohlensäure abspalten. Der Versuch verlief auf folgende Weise:

Versuch.

Etwa 12 g Casein „Hammarsten" wurden in 400 ccm 3n-Salzsäure auf dem Wasserbade gelöst und dann wie gewöhnlich autoklaviert. Aus der so erhaltenen Lösung wurden 3 Portionen à 100 ccm abpipettiert. Die eine Portion (Nr. 1) wurde vorläufig hingestellt; die beiden anderen wurden nochmals autoklaviert, wonach die eine davon (Nr. 2) aus dem Autoklaven entfernt wurde; die dritte wurde wieder autoklaviert.

Die drei Lösungen wurden dann je für sich auf dem Wasserbade möglichst eingeengt und mit Wasser bis auf 100 ccm verdünnt.

Nr. 1 enthielt in 5 ccm 20,90 mg Stickstoff
„ 2 „ „ 5 „ 20,90 „ „
„ 3 „ „ 5 „ 21,00 „ „

Zur Neutralisation von 10 ccm wurde verwendet	und dann zur Formoltitrierung	zusammen	
Nr. 1: 16,70 ccm $^n/_5$-Lauge	13,05 ccm	29,75 ccm	Differenz 0,55 ccm $^n/_5$
„ 2: 17,30 „ „	13,00 „	30,30 „	
„ 3: 17,35 „ „	13,00 „	30,35 „	Differenz 0,05 ccm $^n/_5$

Die Chlormenge pro 10 ccm entsprach für

	Differenz
Nr. 1: 32,45 ccm $^n/_{10}$-Silbernitratlösung	1,45 ccm $^n/_{10}$ = 0,72 ccm $^n/_5$-Lösung
„ 2: 33,90 „ „ „	
„ 3: 34,10 „ „ „	Differenz 0,20 ccm $^n/_{10}$ = 0,10 ccm $^n/_5$-Lösung

Es erhellt hieraus, daß die formoltitrierbare Stickstoffmenge unverändert geblieben ist, und daß die Erhöhung der Acidität sich nur auf die Salzsäure bezieht, und zwar in solcher Weise, daß es ersichtlich ist, daß sich bei dem zweiten und dritten Autoklavieren keine Kohlensäure abspaltete. Die im Casein vorhandenen, beim ersten Autoklavieren nicht total zerstörten Aminosäuren spalten somit Ammoniak, aber keine Kohlensäure beim wiederholten Autoklavieren ab.

Was oben auseinandergesetzt worden ist, spricht sehr dafür, daß im Eiweißmolekül Uraminosäuren vorkommen, ein endgültiger Beweis ist aber noch nicht erbracht. Ein solcher ist nur möglich, wenn es gelingt, irgendeine Uraminosäure aus den Spaltprodukten der Eiweißkörper zu isolieren, was in Bälde versucht werden soll. Es sollen dabei durch Enzyme möglichst weit abgebaute Eiweißkörper als Ausgangsmaterial dienen, denn wenn Uraminosäuren wirklich vorhanden sind, müssen sie sich nach dem oben Erwähnten entweder frei oder in einfacher Bindung hier neben den Aminosäuren befinden.

Wenn es auch nicht gelingt, durch die Enzyme des Verdauungskanals außerhalb des Organismus die Eiweißkörper vollständig in ihre einfachsten Bausteine zu zerlegen, ist es selbstverständlich unmöglich, hieraus etwas über die entsprechenden Verhältnisse im Darmkanal der Tiere zu schließen. In welcher Weise das Ammoniak auch in den Eiweißkörpern gebunden ist, so wird es durch die bekannten Verdauungsenzyme so langsam abgespalten, daß eine Abspaltung durch diese Enzyme im Verdauungskanal kaum möglich ist. Ob

dann die Amide — oder Uraminosäuren, wenn solche vorhanden sind — durch Bakterien oder durch unbekannte Enzyme zerlegt werden, oder ob sie als solche resorbiert und irgendwo im Organismus gespalten oder ausgenutzt werden, das läßt sich aus den vorhandenen Ergebnissen nicht sicher beantworten. Durch das von Henriques und dem einen von uns mitgeteilte Verfahren zur parenteralen Ernährung durch intravenöse Injektion[1]) wird leicht festgestellt werden können, inwiefern in die Blutbahn nach und nach eintretende Amide, wie z. B. Asparagin, durch den Organismus zerlegt werden können oder unverändert zur Ausscheidung gelangen; wenn letzteres der Fall sein sollte, muß auf die Aufspaltung der Amide im Darmkanal geschlossen werden, denn Asparagin oder ähnliche Amide werden ja nicht unter normalen Verhältnissen im Harn ausgeschieden, wenn sie auch sicher im Futter vorhanden sind. In ähnlicher Weise kann selbstverständlich auch das Verhalten der Uraminosäuren im Organismus studiert werden, und es können hierdurch vielleicht auch wertvolle Aufschlüsse gewonnen werden zur Klarlegung der Frage, ob die aus dem Harn in einigen Fällen isolierten Uraminosäuren im Organismus gebildet oder sekundär bei der Aufarbeitung des Harns entstanden sind.

Es sei in dieser Beziehung darauf aufmerksam gemacht, daß die durch Verdauung von Eiweißkörpern in vitro nicht gespaltenen Peptide — von deren Zusammensetzung oben gesprochen wurde — kaum direkt vom Organismus ausgenützt werden können, denn bei permanent-intravenöser Injektion derartiger Präparate erscheinen im Harn erhebliche Mengen peptidgebundenen Stickstoffs[2]). Dies deutet ja auf einen völligen Abbau der Eiweißkörper im Darmkanal hin, es müssen aber weitere Versuche zur Klarlegung dieser Frage angestellt werden.

Bekanntlich sind im Harn des Menschen und mancher Tiere einige stickstoffhaltige Körper, die sogenannten Oxypro-

---

[1]) V. Henriques u. A. C. Andersen: Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 357, 1913.

[2]) V. Henriques u. A. C. Andersen: Zeitschr. f. physiol. Chem. 88, 364, 1913, Tabelle.

teinsäuren, vorhanden, die gewöhnlich als Spaltungs- oder Umwandlungsprodukte der Eiweißkörper aufgefaßt werden. Nach allem was oben über die Spaltung und die Spaltungsprodukte der Eiweißkörper auseinandergesetzt worden ist, muß damit gerechnet werden, daß hier eben ein Teil des durch die Verdauungsenzyme schwer zerlegbaren Anteils des Eiweißmoleküls vorliegen kann, der resorbiert, aber ebenso wie die injizierten Körper (vergleiche oben) wieder ausgeschieden ist, und daß somit auch die Oxyproteinsäuren Uraminosäurekomplexe sind oder jedenfalls Uraminosäuren enthalten können. Was über die Eigenschaften der Oxyproteinsäuren bekannt ist, scheint eine solche Annahme zu bestätigen, weitere Versuche sind jedoch notwendig, um einen sicheren Schluß zu gestatten. Solche Versuche sind längst von dem einen von uns (A.) in Angriff genommen.

Über den Kieselsäuregehalt der menschlichen Bauchspeicheldrüse mit Bemerkungen über die Gewichtsverhältnisse der Drüse in den verschiedenen Lebensaltern.

Von

Hugo Schulz.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Greifswald.)

(Eingegangen am 6. Juni 1915.)

In der Nr. 14 der Münch. med. Wochenschr. vom Jahre 1914 bringt Hanns Kahle auf S. 752 einen Aufsatz: „Einiges über den Kieselsäurestoffwechsel bei Krebs und Tuberkulose und seine Bedeutung für die Therapie der Tuberkulose.“ Auf Grund seiner analytischen Untersuchungen kommt Kahle zu folgendem Schlußergebnis:

1. Das Pankreas steht in inniger Beziehung zum Kieselsäurestoffwechsel des Organismus. Der Kieselsäurestoffwechsel ist bei tuberkulose- und krebskranken Individuen verändert. Bei beiden wird weniger Kieselsäure durch den Harn ausgeschieden, als unter normalen Verhältnissen.

2. Im Pankreas tuberkulöser Menschen ist weniger Kieselsäure vorhanden, als in dem normaler. Das Defizit ist dann von Bedeutung, wenn es gilt, im Organismus Wunden zur Heilung zu bringen, bzw. Granulationsgewebe in Narbengewebe überzuführen. Aus diesem Grunde bedürfte der tuberkulöse Körper jedenfalls reichlicher Mengen von Kieselsäure.

3. Im Pankreas des an Krebs erkrankten Organismus sind bedeutend größere Mengen Kieselsäure vorhanden als im normalen. Eine Erklärung dafür ist vorläufig noch nicht zu geben.

4. Durch die Darreichung von Kieselsäurepräparaten bei experimenteller Tuberkulose tritt eine deutliche Beeinflussung im histologisch-anatomischen Charakter der tuberkulösen Prozesse ein, und zwar in der Art, daß durch die Bildung von jungem Bindegewebe zuerst eine deutliche Abkapselung und allmählich eine Vernarbung des tuberkulösen Gewebes herbeigeführt wird.

Was zunächst den Schlußsatz aus der ersten These: „Bei

beiden, also tuberkulose- und krebskranken Individuen, wird weniger Kieselsäure durch den Harn ausgeschieden, als unter normalen Verhältnissen“ angeht, so ist dabei ein wichtiger Umstand zu bedenken. Ich habe im Jahre 1912 im Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 114, S. 350 die Ergebnisse bekannt gemacht, und sie sind von Kahle auch berücksichtigt worden, die ich bei Untersuchungen über die quantitative Ausscheidung der Kieselsäure durch den menschlichen Harn erhalten hatte. Aus ihnen geht mit zwingender Deutlichkeit die Tatsache hervor, daß die Art der Ernährung an und für sich bereits ein ganz wesentliches Moment für die quantitative Kieselsäureausscheidung durch den Harn darstellt. Aufnahme kieselsäurereicher Nahrung ließ sofort den Gehalt des Harnes an dieser Säure in die Höhe gehen. Es ist also nicht gut angängig, aus dem Gehalt des Harnes an Kieselsäure an und für sich schon irgendwelche Schlüsse zu ziehen auf ihren Stoffwechsel. Wenn man sich überlegt, daß bei der Krankenhausbehandlung vorgeschrittener Tuberkulose oder krebsiger Erkrankung die Eiweißernährung die Hauptrolle spielt, als Brot wohl kaum gerade schrothaltiges, wie z. B. Pumpernickel, verabfolgt und Gemüse auch nicht in erheblichen Mengen gereicht wird, so ist es nicht auffallend, daß der quantitative Befund von Kieselsäure im Harn nicht hoch ausfällt.

Für mich von besonderem Interesse waren beim Studium der Arbeit von Kahle zunächst seine Angaben über den Unterschied im normalen Kieselsäuregehalt des Pankreas gegenüber dem Verhalten bei Erkrankung an Tuberkulose und Carcinom. Es war selbstverständlich von vornherein nicht zu leugnen, daß aus irgendwelchem Grunde ein solcher Unterschied bestehen konnte. Ich beschloß demgemäß, an der Hand eines möglichst großen Materials diese Angabe von Kahle nachzuprüfen, um gegebenenfalls auch meinerseits zur Klärung der Frage beitragen zu können: Enthält bei Tuberkulose das menschliche Pankreas weniger, bei Carcinom mehr Kieselsäure, wie normalerweise? Schon von vornherein ist diese Fragestellung deswegen schwierig mit aller Sicherheit zu bearbeiten, als man wohl kaum je in der Lage sein wird, mit einem nur einigermaßen auskömmlichen Material von Bauchspeicheldrüsen bis zu ihrem Tode völlig gesunder Menschen arbeiten zu können.

Ich bin deshalb so vorgegangen, daß ich bei der Berechnung der Analysen zunächst das gesamte, verarbeitete Material berücksichtigt und aus diesem den Mittelwert berechnet habe, und dann in gleicher Weise, aber nach Abzug der Tuberkulose- und Carcinomfälle, mit dem dann verbleibenden Rest verfuhr.

Ich habe im ganzen 73 Bauchspeicheldrüsen verarbeitet. Das Material verdanke ich meinem Kollegen Paul Grawitz, der mir die Drüsen unmittelbar nach jeder Sektion mit der Diagnose zugehen ließ. Ich bin ihm für dies Entgegenkommen zu großem Dank verpflichtet.

Da in der Literatur nur spärliche Angaben über das mittlere Gewicht der menschlichen Bauchspeicheldrüse aufzutreiben waren, habe ich die Gelegenheit benutzt, auch zu dieser Frage einen Beitrag zu liefern, der den Schluß dieser Arbeit bilden soll.

Gang der Analyse.

Die unmittelbar nach der Sektion aus dem pathologischen Institut herübergebrachte Bauchspeicheldrüse wurde zunächst durch sorgfältiges Präparieren von allem anhängenden Bindegewebe und Fett sowie von allen erreichbaren, mit bloßem Auge sichtbaren Gefäßen befreit. Darauf wurde ihr Gewicht auf einer Tarierwage, die ein Zentigramm noch genau angab, bestimmt. Die Drüse wurde hierbei in einer Porzellanschale von bekanntem Gewicht gewogen und danach in derselben Schale mit der Schere sorgfältig zerkleinert. Sodann wurde die zerkleinerte Masse auf dem Wasserbade möglichst weit vorgetrocknet. Manche Drüsen erwiesen sich als sehr fettreich. In diesem Falle wurde die eingetrocknete Masse zunächst wiederholt mit heißem Äther behandelt, bis äußerlich kein Fett mehr sichtbar war und die Drüsensubstanz, wie die der fettarmen Drüsen, eine gut zerreibliche, körnige Masse darstellte. Es war mir bei der großen Anzahl der verarbeiteten Drüsen nicht möglich, dieselben vollständig zu entfetten. Somit haftet meinen Analysen der Fehler an, daß die Kieselsäurewerte nicht auf absolut fettfreies Material verrechnet werden konnten. Ich gebe diesen Fehler unbedingt zu. Wer aber einmal den Versuch gemacht hat, Pankreasgewebe absolut fettfrei herzustellen, wird bald zu der Einsicht gelangt sein, daß bei der großen Anzahl von Drüsen, die auf ihren Kieselsäuregehalt hin unter-

sucht werden sollten, ich nicht wohl anders, wie oben angegeben, verfahren konnte.

Wenn die Eintrocknung auf dem Wasserbade beendigt schien, wurde die Porzellanschale mit ihrem Inhalt im Exsiccator über Schwefelsäure erkalten gelassen. Dann wurde wieder das Gewicht bestimmt und darauf der Inhalt der Schale mit einem Hornspatel bis auf nicht zu entfernende Spuren in eine fein gestellte Mühle gebracht. Das nach dem Durchmahlen den Mühlengängen noch anhaftende feine Pulver wurde mit Hilfe eines feinen Pinsels sorgfältig herausgefegt und mit dem übrigen Mahlpulver vereinigt. Bei einiger Sorgfalt betrug der hierbei sich ergebende Gesamtverlust an Drüsenmaterial nur selten bis zu einem halben Gramm.

Das sehr feine Drüsenpulver wurde zunächst im ganzen in einem geräumigen Wägeglase gewogen. Dann wurde ein kleiner Teil des Pulvers zur Bestimmung des Trockengehaltes für sich in einem kleinen Wägegläschen abgewogen und bei einer Temperatur zwischen 105 und 110^0 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, was oft lange Zeit in Anspruch nahm. Aus dem dann sich ergebenden Endgewicht des Pulvers wurde der Trockengehalt des ganzen Mahlpulvers und hieraus der der frischen Drüse berechnet.

Der nach Abzug des für die Trockenbestimmung notwendigen Anteils des Drüsenpulvers verbleibende Rest, dessen Gewicht also bekannt war, wurde jetzt in einer geräumigen Platinschale bei ganz niedrigem Feuer in der Muffel verascht. Während der Veraschung wurde die Temperatur nur so weit gesteigert, bis die Tiegelwand eben erkennbare Rotglut zeigte. Zu starkes Erhitzen ist gefährlich. Gibt man von vornherein zu viel Feuer, so beginnt die Masse in der Platinschale zu steigen, fließt über den Rand und die Analyse ist damit verloren. Will man gegen Ende des Veraschungsprozesses durch stärkeres Feuer die Arbeit beschleunigen, so fängt die Masse wegen ihres hohen Salzgehaltes an zu schmelzen, und die Schmelze schließt dann oft größere Kohlenpartikel ein, die nicht mehr zu veraschen sind. Als zweckmäßig erwies sich auch hier wieder folgendes Verfahren: Wenn die in der Platinschale befindliche Masse ordentlich durchgewärmt ist und an der Oberfläche zu verkohlen beginnt, muß man versuchen, ob

die sich entwickelnden Dämpfe brennbar sind. Ist dieser Zeitpunkt erreicht, so zündet man sie an, die ganze Masse verkohlt dann rasch unter Entwicklung einer stark rußenden Flamme, und es bleibt eine sehr lockere Kohle zurück, die nicht mehr steigt und bei hinlänglicher Geduld und Aufmerksamkeit gut verascht.

Der eigentliche Aschengehalt der Drüse wurde nicht aus diesem Material bestimmt, sondern aus dem zur Trockenbestimmung verwendeten. Nach dem Abwägen wurde das feine Drüsenpulver in der Weise in ein Platinschälchen gebracht, daß ich aus dem Wägegläschen bei stark geneigter Haltung desselben ausfließen ließ, was wollte. Der im Wägegläschen verbleibende Rest wurde gewogen und aus der Differenz berechnet, wieviel Trockensubstanz zur Veraschung kam. Man muß bei dieser Prozedur recht vorsichtig sein, damit man nichts durch Verstäuben verliert, was zu falschen Endwerten führen würde. Platinschale mit Inhalt wurden nun in derselben Weise in der Muffel verarbeitet, die ich vorher schon beschrieben habe, nur mit dem Unterschiede, daß die Veraschung im Verhältnis noch auf eine längere Zeit hinaus ausgedehnt wurde. Es bleiben dann schließlich höchstens einmal ganz feine Kohlenflitterchen in geringer Menge übrig, die das Gesamtresultat nicht beeinflussen, wenn man hinlänglich viel Material zur Veraschaung genommen hat. Unter 0,5 g herunter zu gehen empfiehlt sich nicht. Nach völlig fertiggestellter Veraschung wurde die Platinschale, deren Leergewicht vorher bestimmt war, im Exsiccator erkalten gelassen und dann mit ihrem Inhalt schnell gewogen. Der schließlich sich ergebende Gewichtswert wurde dann zur Berechnung des gesamten Aschengehaltes der wasserfreien Drüse benutzt.

Die Bestimmung der Kieselsäure in dem zuerst veraschten Hauptanteil der Drüse wurde dann so ausgeführt, daß auf die abgekühlte Platinschale ein in der Mitte durchbohrtes Uhrglas gelegt wurde. Durch das Loch in dem Uhrglase wurde der Stiel eines kleines Trichterchens geschoben und zunächst etwas destilliertes Wasser, dann starke Salzsäure einfließen gelassen Die Asche enthält kohlensaure Salze. Bei Zutritt der Säure braust die Asche auf. Der dadurch mögliche Substanzverlust wird durch das Aufdecken des Uhrglases verhütet. Wenn keine

Gasentwicklung mehr bemerkbar ist, werden die beiden Seiten des Uhrglases sorgfältig mit warmem, destilliertem Wasser so abgespritzt, daß das abfließende Wasser unmittelbar in die Platinschale fließen kann. Ebenso verfährt man auch mit dem Trichterchen.

Der stark salzsaure Inhalt der Platinschale wird dann in bekannter Weise zunächst auf dem Wasserbade und schließlich im Trockenschrank bei 110° völlig getrocknet. Die getrocknete Masse darf absolut keine freie Salzsäure mehr enthalten. Nach dem Erkalten wird sie zunächst mit wenig konzentrierter Salzsäure übergossen und gleich darauf eine größere Menge heißen destillierten Wassers zugesetzt. Man erwärmt danach noch kurze Zeit auf dem Wasserbade und kann dann die ausgeschiedene Kieselsäure in bekannter Weise bestimmen. Wie bei allen früheren Kieselsäureanalysen habe ich auch diesmal die Säure nach dem Glühen des mit seinem Inhalt gewogenen Platintiegels mit Fluorammonium verjagt und aus der Gewichtsdifferenz bestimmt.

Bei den nun folgenden Analysen habe ich davon abgesehen, alle einzelnen Zahlen zu bringen und mich darauf beschränkt, nur die berechneten prozentualen Werte anzugeben. Sie sind das Ergebnis wiederholter eigener und fremder Berechnung.

Die Analysen.

1.

72jähriger Mann. Bronchitis, Bronchopneumonia, Oedema pulmonum.
Gewicht der frischen Drüse: 72,57 g.
Trockensubstanz: 17,5728%.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 5,4202%.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1992%.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1084 g.

2.

52jähriger Mann. Sepsis post operationem. Alle Organe gesund.
Gewicht der frischen Drüse: 56,98 g.
Trockensubstanz: 20,7073%.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,6682%.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1414%.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0665 g.

3.

14jähriger Knabe. Pneumonia utriusque pulmonis.
Gewicht der frischen Drüse: 74,22 g.
Trockensubstanz: 18,2890%.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,4164%.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1870%.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1191 g.

4.

19 jähriger Mann. Echinococcus pulmonis, Bronchopneumonia gangraenosa.

Gewicht der frischen Drüse: 82,83 g.
Trockensubstanz: 19,2739 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,5606 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1072 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0703 g.

5.

30 jährige Frau. Peritonitis purulenta post operationem.
Gewicht der frischen Drüse: 30,69 g.
Trockensubstanz: 20,7602 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,0539 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1973 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0803 g.

6.

46 jähriger Mann. Tuberculosis miliaris.
Gewicht der frischen Drüse: 60,64 g.
Trockensubstanz: 17,3445 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,1409 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1133 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0696 g.

7.

32 jähriges Mädchen. Peritonitis perforativa post Typhum (6. bis 7. Woche).

Gewicht der frischen Drüse: 68,02 g.
Trockensubstanz: 20,8234 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,2331 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1418 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0884 g.

8.

39 jähriger Mann. Tuberculosis pulmonum et peritonei. Auf dem Peritonealüberzug des Pankreas zahlreiche Tuberkelknötchen.

Gewicht der frischen Drüse: 61,80 g.
Trockensubstanz: 16,9668 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,2705 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0602 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0438 g.

9.

45 jährige Frau. Peritonitis.
Gewicht der frischen Drüse: 40,29 g.
Trockensubstanz: 22,0648 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,8661 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0890 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0433 g.

10.

39 jähriger Mann. Otitis media, Thrombosis sinus.
Gewicht der frischen Drüse: 112,84 g.
Trockensubstanz: 18,7270 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,8432 %.

SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0225 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0154 g.

Wegen des auffallend niedrigen Kieselsäurewertes, den diese Analyse ergeben hatte, habe ich das ganze Waschwasser, das beim Abfiltrieren der Kieselsäure und nachfolgendem Auswaschen derselben erhalten worden war, nochmals zur Trockne eingedampft und auf Kieselsäure untersucht, aber mit völlig negativem Erfolge.

11.

38 jähriger Mann. Pylephlebitis, Perityphlitis, Peritonititis purulenta.
Gewicht der frischen Drüse: 65,98 g.
Trockensubstanz: 19,1855 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,8765 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0378 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0262 g.

12.

61 jähriger Mann. Carcinoma ventriculi.
Gewicht der frischen Drüse: 44,48 g.
Trockensubstanz: 18,4661 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,3621 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1115 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0821 g.

13.

36 jährige Frau. Peritonitis post abortum criminalem.
Gewicht der frischen Drüse: 66,53 g.
Trockensubstanz: 18,3263 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,1518 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1269 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0781 g.

14.

48 jähriger Mann. Peritonitis purulenta post operationem perityphlitidis.
Gewicht der frischen Drüse: 47,33 g.
Trockensubstanz: 23,0824 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,8254 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,3107 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1499 g.

15.

28 jähriger Mann. Tuberculosis pulmonum et pleurae. Ulcera tuberculosa intestini et peritonei.
Gewicht der frischen Drüse: 65,93 g.
Trockensubstanz: 19,1876 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,9691 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0859 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0599 g.

16.

59 jährige Frau. Carcinoma oesophagi, Carcinoma metastaticum hepatis. Pleuritis fibrosa.
Gewicht der frischen Drüse: 47,58 g.
Trockensubstanz: 16,9113 %.

Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,0751 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,3981 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,2816 g.

17.

52 jähriger Mann. Sepsis. Phlegmone cruris dextri.
Gewicht der frischen Drüse: 56,02 g.
Trockensubstanz: 20,6498 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 5,9897 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0823 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0493 g.

18.

51 jähriger Mann. Pneumonia.
Gewicht der frischen Drüse: 91,47 g.
Trockensubstanz: 18,8749 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,6641 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0558 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0372 g.

19.

14 jähriger Knabe. Coxitis tuberculosa. Nephritis chronica parenchymatosa. Degeneratio amyloidea renum, hepatis et lienis.
Gewicht der frischen Drüse: 35,43 g.
Trockensubstanz: 18,8654 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,7802 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1420 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0679 g.

20.

19 jähriges Mädchen. Peritonitis et endometritis post abortum criminalem.
Gewicht der frischen Drüse: 37,80 g.
Trockensubstanz: 22,5804 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 5,7687 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1004 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0579 g.

21.

32 jährige Frau. Tuberculosis pulmonum et pleurae. Ulcera tuberculosa intestini.
Gewicht der frischen Drüse: 77,38 g.
Trockensubstanz: 18,7198 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,5450 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0225 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0147 g.

22.

50 jähriger Mann. Sclerosis multiplex medullae spinalis. Embolia arteriae pulmonalis.
Gewicht der frischen Drüse: 48,45 g.
Trockensubstanz: 19,9614 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 5,5275 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1087 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0601 g.

23.

55 jährige Frau. Ulcus carcinomatosum permagnum cardiae. Atrophia hepatis. Perinephritis chronica.

Gewicht der frischen Drüse: 56,40 g.
Trockensubstanz: 17,2747 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 8,5600 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0395 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0338 g.

24.

27 jährige Frau. Oedema pulmonum. Enteritis follicularis.
Gewicht der frischen Drüse: 64,13 g.
Trockensubstanz: 19,9601 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,9644 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2122 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1690 g.

25.

23 jähriger Mann. Tuberculosis pulmonum et intestini. Cavernae apicum utriusque pulmonis.

Gewicht der frischen Drüse: 59,09 g.
Trockensubstanz: 16,8162 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,2049 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0473 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0341 g.

26.

80 jähriger Mann. Cystitis, Pyelitis, Pyelonephritis, Hypertrophia prostatae.

Gewicht der frischen Drüse: 74,76 g.
Trockensubstanz: 17,8559 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,5730 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0891 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0675 g.

27.

69 jähriger Mann. Tuberculosis pulmonum et intestini.
Gewicht der frischen Drüse: 50,26 g.
Trockensubstanz: 17,7674 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 5,9038 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,7685 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,4537 g.

28.

66 jähriger Mann. Peritonitis post operationem.
Gewicht der frischen Drüse: 91,99 g.
Trockensubstanz: 14,6646 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,9879 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 1,3831 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,6899 g.

Trotz wiederholten Behandelns des Kieselsäurerückstandes im Platintiegel mit Fluorammon blieben einige kleinste, weiße Körnchen zurück, die sich nicht weiter änderten. Nach dem Erkalten hatte das größte der Körnchen einen Stich ins Violette. Weitere, aufeinanderfolgende

Behandlung der Körnchen mit heißer, konzentrierter Salzsäure und ebensolcher Schwefelsäure änderte, soweit ich beobachten konnte, auch nichts. Zusatz von metallischem Zink zu der erkalteten, von den Körnchen abgegossenen Schwefelsäure gab keine Farbenveränderung. Darauf wurden die Körnchen mit saurem schwefelsaurem Kali geschmolzen. Die Schmelze erschien nach dem Erkalten etwas gelblich gefärbt. In Wasser gelöst und mit Ammoniak vorsichtig bis zur alkalischen Reaktion versetzt, zeigte die Lösung eine Spur von Trübung. Vielleicht handelte es sich um die Anwesenheit von Tonerde, Titan ist wohl mit Sicherheit auszuschließen. Bei der äußerst geringen Menge an Material, das überhaupt zur Verfügung stand, ist es mir nicht möglich gewesen, die Natur der weißen Körnchen mit Sicherheit festzustellen.

29.

23 jähriger Mann. Sepsis. Polyarthritis rheumatica.
Gewicht der frischen Drüse: 69,03 g.
Trockensubstanz: 18,1531 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,9414 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0135 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0094 g.

30.

52 jährige Frau. Nephritis parenchymatosa et interstitialis. Pneumonia chronica lobi sinistri superioris. Hydrothorax dexter. Hypertrophia cordis.
Gewicht der frischen Drüse: 61,58 g.
Trockensubstanz: 18,3374 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,3664 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2014 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1282 g.

31.

46 jähriger Mann. Hydrops ascites, Hydropericardium, Anasarca. Endocarditis parietalis fibrosa. Myocarditis fibrosa. Hypertrophia et dilatatio cordis. Pleuritis fibrosa utriusque lateris.
Gewicht der frischen Drüse: 102,25 g.
Trockensubstanz: 14,3003 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 5,9398 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0316 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0188 g.

32.

59 jähriger Mann. Atrophia granulosa renum. Cystitis. Pneumonia dextra. Pleuritis. Hypertrophia cordis.
Gewicht der frischen Drüse: 63,09 g.
Trockensubstanz: 19,6179 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,4976 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0236 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0176 g.

33.

42 jähriger Mann. Bronchiolitis, Bronchitis et Tracheitis chronica catarrhalis et purulenta. Emphysema pulmonum.
Gewicht der frischen Drüse: 45,94 g.

Trockensubstanz: 19,0198 %.

Aschengehalt der Trockensubstanz: 5,5477 %.

Bei der Bestimmung der Kieselsäure blieb nach Abzug der Filterasche beim Wägen kein Rest mehr übrig. — Es sei noch bemerkt, daß der Patient einige Zeit vor seinem Tode an Rachendiphtherie erkrankt war und eine postdiphtherische Lähmung zurückgeblieben war. Es ließ sich nicht mehr feststellen, auf welches Gebiet diese Lähmung sich erstreckt hat.

34.

25 jähriges Mädchen. Ulcera luetica ilei. Peritonitis fibrinosa. Pleuritis fibrosa utriusque lateris. Aorta chlorotica.

Gewicht der frischen Drüse: 23,19 g.

Trockensubstanz: 18,8115 %.

Aschengehalt der Trockensubstanz: 8,7813 %.

SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1129 %.

SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0992 g.

35.

48 jährige Frau. Status puerperalis. Haemorrhagia toxica cerebri. Hepatitis toxica cum ictero. Haemorrhagiae hepatis multiplices. Tumor lienis ex hyperaemia. Diagn. clin.: Eclampsia.

Gewicht der frischen Drüse: 83,59 g.

Trockensubstanz: 19,1611 %.

Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,9023 %.

SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0753 %.

SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0595 g.

36.

72 jähriger Mann. Endocarditis bacterica recens. Embolia maligna renis dextri. Encephalitis haemorrhagica. Arteriosclerosis.

Gewicht der frischen Drüse: 46,31 g.

Trockensubstanz: 20,6925 %.

Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,2650 %.

SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1434 %.

SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1042 g.

37.

41 jährige Frau. Anaemia perniciosa aplastica. — Die Leiche sah ganz wachsgelb aus.

Gewicht der frischen Drüse: 64,25 g.

Trockensubstanz: 20,6918 %.

Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,9595 %.

SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0325 %.

SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0161 g.

38.

9 jähriges Mädchen. Peritonitis purulenta post exstirpationem processus vermiformis.

Gewicht der frischen Drüse: 14,04 g.

Trockensubstanz: 17,6104 %.

Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,1992 %.

In der Platinschale fand sich nach dem Behandeln der Asche mit Salzsäure ein kleines, grau gefärbtes Körnchen neben dem sonstigen

Inhalt. Da die Möglichkeit vorlag, daß dasselbe von der Chamottesubstanz der Muffel im Veraschungsofen herrühren konnte, mußte die Kieselsäurebestimmung verworfen werden.

39.

50 jähriger Mann. Sarcoma testiculi metastaticum.
Gewicht der frischen Drüse: 67,64 g.
Trockensubstanz: 17,7124 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 9,5477 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0186 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0178 g.

40.

41 jähriger Mann. Lymphadenitis axillaris apostematosa. Splenitis septica subchronica. Osteomyelitis hyperplastica femoris. Leucaemia myelogenica imminens.
Gewicht der frischen Drüse: 49,58 g.
Trockensubstanz: 20,0853 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,1099 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1676 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1024 g.

41.

67 jährige Frau. Peritonitis purulenta.
Gewicht der frischen Drüse: 47,85 g.
Trockensubstanz: 14,5427 g.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,4227 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2421 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1555 g.

42.

50 jähriger Mann. Pleuritis purulenta.
Gewicht der frischen Drüse: 54,03 g.
Trockensubstanz: 19,1399 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,0962 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0293 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0208 g.

43.

85 jähriger Mann. Marasmus senilis. Arteriosclerosis coronariae et arteriarum piae matris. Oedema pulmonum.
Gewicht der frischen Drüse: 55,57 g.
Trockensubstanz: 19,3446 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,4319 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1866 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0827 g.

44.

30 jähriger Mann. Nephritis haemorrhagica chronica. Bronchitis purulenta. Endocarditis fibrinosa. Dilatatio cordis.
Gewicht der frischen Drüse: 53,73 g.
Trockensubstanz: 16,5937 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 8,2365 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0912 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0751 g.

45.

16 jähriger Junge. Otitis media. Meningitis purulenta.
Gewicht der frischen Drüse: 36,18 g.
Trockensubstanz: 17,6177 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 5,0264 %.
Wie bei der Analyse 33, blieb auch hier nach Abzug der Filterasche schließlich kein Rest mehr übrig.

46.

42 jähriger Mann. Tuberculosis pulmonum gangraenosa.
Gewicht der frischen Drüse: 115,90 g.
Trockensubstanz: 15,8671 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 8,4795 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2607 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,2211 g.

47.

22 jähriges Mädchen. Uterus puerperalis. Endometritis diphtherica incipiens. Haemorrhagiae corporis striati et pontis.
Gewicht der frischen Drüse: 45,84 g.
Trockensubstanz: 16,1834 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,5198 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0641 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0290 g.

48.

68 jähriger Mann. Fractura basis cranii. Oedema piae matris. Arteriosclerosis cerebri. Pleuritis fibrosa et fibrinosa. Pneumonia cruposa. Bronchitis purulenta. Perisplenitis fibrosa. Nephritis interstitialis. Hepatitis interstitialis chronica. Gastritis chronica.
Gewicht der frischen Drüse: 52,87 g.
Trockensubstanz: 18,1642 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,0396 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2488 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1503 g.

49.

25 jähriger Mann. Bronchitis caseosa chronica. Peribronchitis fibrosa. Phthisis pulmonum ulcerosa. Ulcera intestini tuberculosa. Peritonitis tuberculosa.
Gewicht der frischen Drüse: 64,75 g.
Trockensubstanz: 17,9402 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,7601 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0876 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0680 g.

50.

38 jährige Frau. Haemorrhagia recens intermeningealis. Haemorrhagia piae matris. Aneurysma arteriae basis cranii.
Gewicht der frischen Drüse: 56,92 g.
Trockensubstanz: 16,9097 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,2447 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1736 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1084 g.

51.

57 jährige Frau. Carcinoma vesicae felleae. Carcinoma metastaticum diaphragmatis, hepatis, omenti, peritonei. Hydrops ascites sanguinolentus. Oedema pulmonum. Pleuritis fibrinosa. Bronchitis.

Gewicht der frischen Drüse: 72,29 g.
Trockensubstanz: 18,8114 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 8,3770 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2629 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,2208 g.

52.

29 jähriger Mann. Pericarditis purulenta. Empyema utriusque lateris. Bronchitis. Pneumonia interstitialis. Splenitis chronica.

Gewicht der frischen Drüse: 76,38 g.
Trockensubstanz: 18,7677 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,8448 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0628 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0304 g.

53.

60 jähriger Mann. Pneumonia interstitialis chronica.

Gewicht der frischen Drüse: 39,67 g.
Trockensubstanz: 16,3605 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 5,4333 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2019 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1087 g.

54.

40 jährige Frau. Carcinoma uteri et ovariorum. Hydronephrosis et atrophia totalis renis dextri. Bronchopneumonia.

Gewicht der frischen Drüse: 55,95 g.
Trockensubstanz: 17,0159 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,3380 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2168 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1374 g.

55.

61 jähriger Mann. Pyaemia gonorrhoica. Prostatitis apostematosa gonorrhoica. Abscessus vesicarum seminalium et renum. Tumor lienis chronicus. Bronchopneumonia.

Gewicht der frischen Drüse: 65,49 g.
Trockensubstanz: 19,4139 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 3,6999 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2157 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0798 g.

56.

61 jährige Frau. Carcinoma curvaturae minoris ventriculi, prope pylorum exulceratum. Peritonitis circumscripta. Perisplenitis fibrosa. Abscessus musculi recti abdominis.

Gewicht der frischen Drüse: 57,50 %.
Trockensubstanz: 19,9901 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,8449 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,3431 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,2692 g.

57.

79jähriger Mann. Pneumonia.
Gewicht der frischen Drüse: 37,33 g.
Trockensubstanz: 20,8963 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,6300 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2012 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1535 g.

58.

32jährige Frau. Morbus Basedowii.
Gewicht der frischen Drüse: 44,97 g.
Trockensubstanz: 14,4434 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,8241 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2727 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1861 g.

59.

20jähriger Mann. Tumor cerebri.
Gewicht der frischen Drüse: 40,28 g.
Trockensubstanz: 20,9392 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,5775 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1175 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0773 g.

60.

25jährige Frau. Peritonitis purulenta traumatica.
Gewicht der frischen Drüse: 44,44 g.
Trockensubstanz: 16,5061 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,3426 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,3201 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1390 g.

61.

51jährige Frau. Bronchopneumonia.
Gewicht der frischen Drüse: 49,75 g.
Trockensubstanz: 17,2181 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 8,2390 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1706 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1406 g.

62.

13jähriger Knabe. Tuberculosis miliaris.
Gewicht der frischen Drüse: 31,33 g.
Trockensubstanz: 17,9342 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,1309 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1718 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1225 g.

63.

68jährige Frau. Carcinoma ventriculi. Peritonitis carcinomatosa.
Gewicht der frischen Drüse: 35,31 g.
Trockensubstanz: 17,1122 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,4167 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1572 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1009 g.

64.

76jähriger Mann. Carcinoma ventriculi.
Gewicht der frischen Drüse: 30,73 g.
Trockensubstanz: 20,6440 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,9814 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,5482 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,2731 g.

65.

55jährige Frau. Peritonitis purulenta. Embolia arteriae pulmonalis.
Gewicht der frischen Drüse: 60,01 g.
Trockensubstanz: 21,8259 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 5,7119 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,1969 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1125 g.

66.

55jährige Frau. Embolia arteriae pulmonalis.
Gewicht der frischen Drüse: 61,65 g.
Trockensubstanz: 20,5750 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 5,9239 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,3143 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1862 g.

67.

4jähriger Knabe. Enteritis follicularis.
Gewicht der frischen Drüse: 19,63 g.
Trockensubstanz: 17,9098 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 7,2304 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2669 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1930 g.

68.

68jähriger Mann. Lues universalis.
Gewicht der frischen Drüse: 29,58 g.
Trockensubstanz: 17,3715 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 5,8904 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,4125 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,2430 g.

69.

62jährige Frau. Peri- et Parametritis chronica. Embolia arteriae pulmonalis.
Gewicht der frischen Drüse: 39,16 g.
Trockensubstanz: 18,2222 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,5414 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,9144 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,4153 g.

70.

45jähriger Mann. Peritonitis purulenta.
Gewicht der frischen Drüse: 95,78 g.
Trockensubstanz: 18,1125 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 5,2287 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,3595 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1880 g.

71.

19jähriger Mann. Tuberculosis renum et vesicae.
Gewicht der frischen Drüse: 40,94 g.
Trockensubstanz: 21,4189 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,0673 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,8349 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,3396 g.

72.

69jähriger Mann. Bronchopneumonia.
Gewicht der frischen Drüse: 57,37 g.
Trockensubstanz: 24,4180 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 4,0179 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,5089 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,2045 g.

73.

43jährige Frau. Carcinoma uteri.
Gewicht der frischen Drüse: 46,28 g.
Trockensubstanz: 22,4611 %.
Aschengehalt der Trockensubstanz: 6,1440 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,0558 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,0343 g.

Das Ergebnis der Analysen.

Wenn man aus allen von mir erhaltenen Werten das Mittel berechnet, so ergibt sich zunächst folgendes Resultat:

Gewicht der frischen Drüse: 56,82 g.
Trockensubstanz: 18,7472 %.
Aschengehalt: 6,3144 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2071 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1205 g.

Berechnet man die mittleren Werte so, daß alle Drüsen, die von tuberkulös oder an Carcinom erkrankten Individuen herstammen, unberücksichtigt bleiben, so ändern sich die eben angeführten Werte wie folgt:

Gewicht der frischen Drüse: 57,1189 g.
Trockensubstanz: 18,8715 %.
Aschengehalt: 6,0780 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2034 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1307 g.

Kahle gibt auf Grund von 6 Analysen solcher Bauchspeicheldrüsen, von denen „man annehmen durfte, daß der normale Kieselsäuregehalt nicht gestört sein würde“, den mitt-

leren Kieselsäuregehalt des Pankreas auf 0,14 bis 0,15 g für das Kilo Trockensubstanz an. Diese Werte liegen höher wie die von mir erhaltenen. Es ist möglich, daß dieser Unterschied ein rein zufälliger ist. Man wird von vornherein wohl nicht in der Lage sein, mit auch nur einiger Berechtigung annehmen zu können, ob der Kieselsäuregehalt einer Bauchspeicheldrüse sich innerhalb oder außerhalb normaler Werte bewegt, weil über diesen Punkt doch eigentlich bis jetzt noch nichts feststeht. Hätte ich zum Beispiel zufällig nur die 5 Fälle zur Analyse bekommen, die unter den Nummern 24, 48, 57, 58, 66 in ihren Einzelheiten näher angegeben worden sind, so würde sich ein noch höherer Wert für den Kieselsäuregehalt der Bauchspeicheldrüse ergeben, wie der von Kahle angenommene. Es handelte sich bei den genannten 5 Fällen bei 24 um Lungenödem und Enteritis follicularis, Fall 48 war klinisch auf Pneumonie behandelt, im Falle 57 war dieselbe Diagnose anatomisch bestätigt worden, Fall 58 betraf einen Morbus Basedowii und Fall 66 eine Embolie der Lungenarterie. Irgendein Grund zu der Annahme, daß der Kieselsäuregehalt der Bauchspeicheldrüse in einem dieser Fälle von der Norm abwegig gewesen sei, lag nicht vor. Berechnet man das Mittel aus den Kieselsäurewerten der Trockensubstanz in diesen 5 Fällen, so erhält man das Ergebnis; 0,1690 g für das Kilo Trockensubstanz! Und ebenso hätte ich bei einer ebenfalls zufälligen anderen Herkunft zu ganz erheblich niedrigeren Werten gelangen können wie die von Kahle angenommenen. Man wird mir beipflichten in der Überzeugung, daß, wenn man brauchbare Mittelwerte erhalten will, das zu ihrer Bestimmung dienende Material nie reichhaltig genug sein kann.

Ich muß mich jetzt zu der zweiten These wenden, die Kahle zum Schluß seiner Arbeit aufgestellt hat: „Im Pankreas tuberkulöser Menschen ist weniger Kieselsäure vorhanden, als in dem normaler.“

Ich habe im ganzen 11 Bauchspeicheldrüsen analysieren können, bei deren Besitzern Tuberkulose sicher festgestellt worden war: 6, 8, 15, 19, 21, 25, 27, 46, 49, 62 und 71. Des Vergleiches wegen stelle ich die bei diesen Analysen erhaltenen Werte neben die aus allen Analysen sich ergebenden:

	Gesamt-Mittel	Tuberkulose-Mittel
Gewicht der frischen Drüse . .	56,82 g	65,77 g
Trockensubstanz	18,7472 %	18,0753 %
Aschengehalt	6,3144 %	6,5684 %
SiO_2 in der Asche	0,2071 %	0,2359 %
SiO_2 in 1000 g Trockensubstanz	0,1205 g	0,1359 g

Es ergibt sich aus dieser Übersicht, daß der Kieselsäuregehalt der Bauchspeicheldrüse bei Tuberkulose im Mittel nicht niedriger, sondern im Gegenteil deutlich höher liegt, wie wenn man denselben Wert aus sämtlichen Analysen dem Vergleiche zugrunde legt. In einzelnen Fällen kann der Mittelwert bei Tuberkulose sogar ganz erheblich hoch ausfallen. So erhielt ich bei den Analysen 27 und 46 die Zahlen: 0,4537 g und 0,2211 g Kieselsäure für das Kilo Trockensubstanz.

Auch die Annahme, daß bei Gravidität und gleichzeitig bestehender Tuberkulose der negative Ausfall der Kieselsäurebestimmung dadurch zu erklären sei, daß der mütterliche Organismus durch Abgabe der Säure an den Fötus verarmt sei und dies speziell beim Pankreas zum Ausdruck gelange, erscheint mir nicht völlig sichergestellt. Ich habe in 2 Fällen, bei 33 und 45, keine Kieselsäure nachweisen können. Beide Fälle betreffen aber Bauchspeicheldrüsen männlicher Individuen.

Im Gegensatz zur Tuberkulose fand Kahle bei Carcinom eine Anreicherung der Kieselsäure in der Bauchspeicheldrüse. Diesen Befund kann ich bestätigen, allerdings mit Vorbehalt.

Es standen mir 9 Fälle von Carcinom zur Verfügung: 12, 16, 23, 51, 54, 56, 63, 64, 73 und ein Fall von Sarkom: 39. Diesen letzteren Fall habe ich bei der Bestimmung der mittleren Werte nicht mit berücksichtigt.

Gewicht der frischen Drüse: 49,60 g.
Trockensubstanz: 18,7430 %.
Aschengehalt: 7,0133 %.
SiO_2-Gehalt der Asche: 0,2370 %.
SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1592 g.

Diese Werte unterscheiden sich von den bisher besprochenen durch das erheblich niedrigere Gewicht der frischen Drüse, den höheren Aschengehalt und, wie schon gesagt, den höheren Kieselsäuregehalt in der Trockensubstanz.

Daß aber aus diesen höheren Kieselsäurewerten der Schluß auf ein konstantes Verhalten bei Carcinom nicht angängig ist, zeigen die beiden Analysen 12 und 23. Bei beiden handelte es sich um Magencarcinom. Im ersten Falle erhielt ich 0,0821 g Kieselsäure auf 1000 g Pankreastrockensubstanz, im zweiten 0,0338 g. Diese beiden Werte liegen weit unter dem normalen Mittel. Es ist also auch hier wieder der Zufall mit im Spiele gewesen, wenn ich als Mittelwert bei Carcinomerkrankung die Zahl 0,1592 herausrechnen konnte. Wie wenig man sich bei ungenügend großem Material auf derartige Mittelwerte verlassen darf und wie bedenklich es ist, auf sie dann theoretische Ansichten und Spekulationen zu begründen, ergibt sich aus meinen Analysen 27 und 28. Die erste betraf eine Tuberkulose und lieferte 0,4537 g Kieselsäure auf 1000 g Pankreastrockensubstanz, die zweite Bauchspeicheldrüse stammte von einem an Peritonitis nach einer Operation zugrunde gegangenen Mann und ergab 0,6899 g! Das sind Werte, die weitaus über alle bisher besprochenen Mittelwerte herausgehen.

Ich kann nach diesem Kahle nicht beipflichten, wenn er den Satz als allgemeingültig aufstellt, daß bei Carcinom das Pankreas mehr Kieselsäure enthalten soll wie unter normalen Verhältnissen.

Wieviel andere Momente für das Vorhandensein von mehr oder weniger Kieselsäure im Pankreas in Betracht kommen können, mag schließlich auch die nachfolgende Übersicht noch erweisen.

Wenn man sich die Mühe nehmen will, aus sämtlichen Fällen, wo es sich bei meinem Material um Peritonitis gehandelt hatte, das Mittel für den Aschenwert sowie die Kieselsäurewerte in der Asche und der Trockensubstanz zu berechnen, so erhält man folgende Zahlen:

Aschengehalt: 5,5877 %.

SiO_2-Gehalt der Asche: 0,3389 %.

SiO_2-Gehalt in 1000 g Trockensubstanz: 0,1727 g.

Wie man sofort erkennt, liegen hier die Kieselsäurewerte für die Trockensubstanz noch erheblich höher wie bei den Carcinomfällen.

Ich denke bisher den Beweis dafür erbracht zu haben, daß es nicht erlaubt ist, den Kieselsäuregehalt der Bauch-

speicheldrüse als typischen Ausdruck für eine oder die andere konstitutionelle Erkrankung anzusprechen.

Daran schließt sich unmittelbar die Frage an: Besteht überhaupt irgendeine charakteristische Beziehung zwischen Pankreas und Kieselsäure?

Ausgesprochen ist diese Anschauung zuerst, worauf schon Kahle aufmerksam macht, auf dem Kongreß für innere Medizin in Wiesbaden im Jahre 1902 von Rohden. Im Bericht darüber heißt es wörtlich: Die reichlichsten Mengen Kieselsäure sind in der Bauchspeicheldrüse aufgehäuft. Im Pankreas scheint eine Art Kieselsäurereservoir für den Organismus geschaffen zu sein.

Woher Rohden diese Weisheit kommt, habe ich ebensowenig wie Kahle herausbringen können. Das bis dahin vorliegende Material an Zahlen, auf das Rohden sich, wie es scheint, verlassen hat, sind ganze zwei Analysen, die von Kall im Jahre 1898 veröffentlicht worden sind. Man muß, falls Rohden nicht mit einem bisher überhaupt noch nicht bekanntgegebenen analytischen Material gearbeitet hat, staunen über die Kühnheit, mit der er die Bauchspeicheldrüse als Kieselsäurereservoir für den Organismus anspricht.

Soweit wie wir bisher über die Verteilung und das Vorkommen von Kieselsäure im Organismus des Menschen überhaupt etwas Sicheres wissen, können wir nur sagen: Kieselsäure und Bindegewebe stehen in irgendeiner, ihrem letzten Grunde nach allerdings noch unbekannten, näheren Beziehung zueinander. Das hat sich aus meinen bisherigen Arbeiten auf diesem Felde mit aller Gewißheit bestätigt, und es kommt noch dazu, daß dieser Kieselsäuregehalt des Bindegewebes um so höher ausfällt, auf je jüngerem Entwicklungszustande sich das Gewebe befindet. Bis heute können wir Schwankungen im Kieselsäuregehalt irgendeines Organes immer noch am einfachsten so erklären, daß wir sie von dem Gehalt des Organes an Bindegewebe unmittelbar abhängig sein lassen, abgesehen von einem zufälligen, reichlicheren Blutgehalt, wie das die Fälle von Peritonitis vorher ergaben.

Daß die Kieselsäure Degenerationsvorgänge des Bindegewebes günstig zu beeinflussen imstande ist und zu diesem Zweck schon seit einem Jahrhundert angewandt wird, ergibt

sich aus dem Studium der Literatur der homöotherapeutischen Schule.

Da mir das Material doch zur Verfügung stand, habe ich noch eine Anzahl Berechnungen vorgenommen, die lediglich die Gewichtsverhältnisse der Bauchspeicheldrüse sowie ihres Gehaltes an Trockensubstanz, Asche und Kieselsäure, auf mittlere Werte berechnet, zum Gegenstande hatten. Das Ergebnis derselben lasse ich hier folgen:

Aus den von mir analysierten Bauchspeicheldrüsen ergab sich als mittleres Gewicht für die frische Drüse: 56,82 g.

Für die Drüsen männlicher Individuen berechnete sich das mittlere Gewicht auf 59,88 g, für die Drüsen weiblicher Individuen auf 51,90 g.

Das höchste beobachtete Gewicht zeigte die Bauchspeicheldrüse eines an Tuberkulose zugrunde gegangenen Mannes mit 115,90 g, das niedrigste Gewicht, wenn man von den Bauchspeicheldrüsen kindlicher Leichen absehen will, ein Fall von Lues mit 29,58 g.

Nach dem Lebensalter von 10 zu 10 Jahren berechnet, ergeben sich für die Bauchspeicheldrüse folgende Werte:

0	bis	10	Jahre:	16,83 g	aus	2	Bestimmungen,
10	„	20	„ :	48,39 g	„	7	„
20	„	30	„ :	55,31 g	„	10	„
30	„	40	„ :	63,89 g	„	10	„
40	„	50	„ :	67,31 g	„	12	„
50	„	60	„ :	60,49 g	„	14	„
60	„	70	„ :	50,95 g	„	12	„
70	„	80	„ :	46,75 g	„	4	„
80	„	90	„ :	65,16 g	„	2	„

Abgesehen von dem hohen Wert für das Lebensalter von 80 bis 90 Jahren, dem, wie die Übersicht zeigt, nur zwei Wägungen zugrunde liegen, scheint die Bauchspeicheldrüse des Menschen im Alter von 40 bis 50 Jahren ihr Höchstgewicht zu erreichen.

Was den Gehalt der Bauchspeicheldrüse an Trockensubstanz anlangt, so habe ich dafür folgende Werte berechnen können.

Der mittlere Gehalt an Trockensubstanz beträgt

18,7472 g.

Den höchsten Wert fand ich bei einem 69 jährigen Individuum mit 24,4180 g, den niedrigsten bei einem 46 jährigen mit 14,3003 g.

Nach den Lebensaltern geordnet, ergeben sich für den Trockengehalt folgende Zahlen:

0 bis 10 Jahre: 17,7601 %	50 bis 60 Jahre: 19,1157 %
10 „ 20 „ : 19,4257 %	60 „ 70 „ : 18,0411 %
20 „ 30 „ : 18,3265 %	70 „ 80 „ : 19,9514 %
30 „ 40 „ : 18,1436 %	80 „ 90 „ : 18,6002 %
40 „ 50 „ : 19,1005 %	

Der Aschengehalt der Bauchspeicheldrüse belief sich bei meinem Material im Mittel auf

6,3144 %.

Den höchsten Aschengehalt fand ich bei einem 50 jährigen Individuum mit 9,5477 %, den niedrigsten bei einem 61 Jahre alten mit 3,6999 %.

Nach den Lebensaltern, wie vorher geordnet, ergeben sich für den Aschengehalt folgende Werte:

0 bis 10 Jahre: 7,2148 %	50 bis 60 Jahre: 6,9460 %
10 „ 20 „ : 5,6787 %	60 „ 70 „ : 5,7134 %
20 „ 30 „ : 6,5906 %	70 „ 80 „ : 6,3241 %
30 „ 40 „ : 6,5279 %	80 „ 90 „ : 6,0024 %
40 „ 50 „ : 6,0401 %	

Der Kieselsäuregehalt der Asche betrug im Mittel

0,2071 %.

Den höchsten Gehalt mit 1,3831 % ergab die Bauchspeicheldrüse eines 66 jährigen Individuums. Den niedrigsten gleich Null, also nicht mehr nachweisbar, fand ich bei zwei Individuen von 42 bzw. 16 Jahren. Für die nach den Lebensjahren geordnete Übersicht ist zu bemerken, daß hier, wie bei dem Kieselsäuregehalt, für die Trockensubstanz dem Lebensalter bis zu 10 Jahren nur eine Bestimmung zugrunde gelegt werden konnte.

0 bis 10 Jahre: 0,2669 %	50 bis 60 Jahre: 0,1460 %
10 „ 20 „ : 0,2216 %	60 „ 70 „ : 0,4590 %
20 „ 30 „ : 0,1124 %	70 „ 80 „ : 0,2730 %
30 „ 40 „ : 0,1146 %	80 „ 90 „ : 0,1378 %
40 „ 50 „ : 0,1427 %	

Was schließlich den mittleren Kieselsäurewert für 1 kg Trockensubstanz angeht, so belief sich dieser auf

0,1205 g.

Den höchsten Wert ergab das Pankreas eines an Peritonitis zugrunde gegangenen Mannes von 66 Jahren mit 0,6899 g. Für den niedrigsten Wert gilt dasselbe, was für den Kieselsäuregehalt der Asche schon gesagt wurde.

Nach den Lebensaltern geordnet, enthielten die von mir untersuchten Drüsen auf 1 kg Trockensubstanz:

0 bis 10 Jahre:	0,1930 g		50 bis 60 Jahre:	0,0986 g
10 „ 20 „ :	0,1110 g		60 „ 70 „ :	0,2461 g
20 „ 30 „ :	0,0715 g		70 „ 80 „ :	0,1598 g
30 „ 40 „ :	0,0716 g		80 „ 90 „ :	0,0751 g
40 „ 50 „ :	0,0866 g			

Daß die sämtlichen hier angeführten Werte sich noch ändern können, wenn ein noch größeres Material an Drüsen untersucht worden ist, liegt auf der Hand. Von besonderem Interesse würde es sein, wenn in der Folge auch weiterhin die auffallend hohen Werte für das Lebensalter von 60 bis 80 Jahren ihre Bestätigung finden sollten.

Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide XX.

Zur allgemeinen Chemie der Caseinate. I.

Von

Wolfgang Pauli.

(Aus dem Laboratorium für physikalisch-chemische Biologie der k. k. Universität Wien.)

(Eingegangen am 10. Juni 1915.)

Mit 1 Figur im Text.

Unter den Eiweißkörpern ist das Casein der Kuhmilch dank der von O. Hammarsten angegebenen Darstellungsmethode als Präparat von einheitlicher Zusammensetzung und gut reproduzierbarem Verhalten besonders leicht zugänglich und hat deshalb wiederholt als Material für physikalisch-chemische Untersuchungen gedient. Allerdings wurden solche infolge seiner unmeßbar kleinen Löslichkeit in Wasser nur an seinen Salzen ausgeführt. Die wichtigste dieser Untersuchungen stammt von E. Laqueur und O. Sackur[1]) und hat unter Verwendung der Viscosimetrie und elektrischen Leitfähigkeitsmessung grundlegende Erkenntnisse über die physikalische Chemie der Proteine und interessante, wenn auch nicht einwandfreie Versuche zur Ermittlung des Molekulargewichtes des Caseins gebracht.

Unsere eigenen Bemühungen galten neben der Ausfüllung verschiedener von den früheren Untersuchern offen gelassener Lücken, vor allem der Aufklärung jener zahlreichen Widersprüche, welche die umfassenden neueren Arbeiten T. B. Robertsons[2]) am Casein gegenüber anderweitigen Versuchen an an-

---

[1]) E. Laqueur und O. Sackur, Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 3, 193, 1903.

[2]) T. B. Robertson, Die physikalische Chemie der Proteine. Dresden 1912. Daselbst Literatur.

deren Proteinen ergeben hatten. Durch diese Widersprüche war zugleich eine Grundfrage der allgemeinen Chemie der Eiweißkörper berührt worden, die Frage, wie weit die Reaktion verschiedener Proteine mit Säuren und Basen einer einheitlichen Auffassung untergeordnet werden könne.

Bereitung der Lösungen.

Unsere Messungen[1]) wurden an nach Hammarsten dargestellten reinsten Caseinpräparaten — die von E. Merck und Kahlbaum bezogenen zeigten das gleiche Verhalten — ausgeführt. In guter Übereinstimmung mit den Mittelwerten von E. Laqueur und O. Sackur (0,88) fanden wir bei Titration gegen Phenolphthalein ein Basenäquivalent von 0,9 Millimol Natriumhydroxyd für 1 g Casein. Trocknen des Caseins bei 100° führt zu einem Gewichtsverlust von 10%, zugleich kommt es zu einer Spaltung desselben (E. Laqueur und O. Sackur), weshalb die folgenden Beobachtungen an mit lufttrockenem Casein bereiteten Lösungen ausgeführt wurden. Von dem Aschegehalt des Präparats konnte für unsere Zwecke abgesehen werden. Vorsichtiges Veraschen von 4 g Casein und Lösung des Rückstandes in heißem Wasser (100 ccm) ergab in wiederholten Bestimmungen keine Gefrierpunktsänderung, ebenso nicht die Aufschwemmung dieser Caseinmenge in Wasser. Wird die Genauigkeit dieser Methode nur auf $\pm$ 0,003° geschätzt, so würde der Salzfehler bei einer 4%igen Caseinlösung unter $^{n}/_{1000}$ liegen. Dieses Verhältnis wird in unseren Versuchen noch günstiger, da in der Regel 0,5%ige Caseinlösungen zur Anwendung kamen, die durch Verdünnung einer 1%igen Stammlösung gewonnen wurden. Diese Ausgangslösung wurde durch Zusammenbringen von 10 g Casein und 90 ccm 0,1 n-Lauge, die vorher verdünnt worden waren, unter Auffüllen auf 1 l Gesamtvolumen bereitet. Nach 12stündigem Stehen unter wiederholtem Aufschütteln war das ganze Casein klar gelöst. Toluolzusatz bewirkt eine allmähliche Trübung, weshalb die Lösung nur durch Aufbewahren im Eiskasten keimfrei gehalten und immer nach wenigen Tagen frisch bereitet wurde. Die Versuche einer zusammenhängenden Reihe wurden überdies an Verdünnungen ein und derselben Stammlösung ausgeführt.

[1]) Bei diesen wurde ich in dankenswerter Weise von den Herren Ing. F. Kryz und Ing. E. Strauß unterstützt.

Robertson suchte die Lösung des Caseins durch einen höheren Laugenzusatz zu beschleunigen, der dann durch Zugabe von Salzsäure nach Bedarf abgestumpft wurde. Seine Lösungen enthalten also wechselnde Mengen von Neutralsalz. Es zeigte sich jedoch in unseren Versuchen, daß der Salzgehalt von erheblichem Einfluß auf das Verhalten der Caseinate ist, und ebenso ist es nicht gleichgültig, ob, wie bei unserem Vorgehen, von vornherein nur das zur Lösung notwendige Alkali schon verdünnt oder eine höhere Laugenkonzentration auf das Casein eingewirkt hat.

I. Viscosimetrische Versuche.

Bei Zusatz von sehr schwachen Alkaligaben und selbst bei bloßer Verdünnung treten schon bei niederen Temperaturen in Caseinatlösungen bisher kaum beachtete zeitliche Veränderungen auf, die ziemlich rasch verlaufen und sich ausgiebiger erwiesen, als man nach unseren anderweitigen Erfahrungen am Alkalialbumin hätte erwarten können. Zur Verfolgung dieser zeitlichen Vorgänge in ihren ersten Stadien erwies sich die viscosimetrische Methode, in der üblichen Weise nach W. Ostwald im durchsichtigen Thermostaten ausgeführt, allen anderen Verfahren weitaus überlegen. Eine nach der obigen Vorschrift hergestellte Stammlösung von 1 % Caseingehalt mit 0,009 n-Lauge zeigte durch 7 Tage bei Fernhalten von Fäulnis keine Änderung der Viscosität, dann allmählichen Abfall derselben.

Diese Bemerkung gilt nur abgesehen von den in den ersten Stunden der frischen Bereitung stattfindenden Änderungen der Viscosität. So betrugen die relativen Reibungen einer Stammlösung von 1 % Casein in 0,009 n-KOH am 5., 7., 12. und 13. Tage nach der Auflösung jeweilig 1,2471, 1,2471, 1,2095 und 1,1948.

In der durch Verdünnung der Stammlösung auf die Hälfte hergestellten Caseinatlösung läßt sich die Reibungsänderung sehr gut fortlaufend vom Beginne der Mischung an verfolgen. Wie die folgenden Versuche zeigen, tritt bei 15° nach rund 1 Stunde eine zumindest mehrstündige Konstanz des Reibungswertes ein.

Tabelle I.

0,5 % Casein + 0,005 n-KOH bei 15°.

Zeit nach der Bereitung	sofort	6′	10′	20′	30′	41′	51′	60′
η	1,248	1,235	1,229	1,165	1,111	1,093	1,093	1,093

0,5 % Casein + 0,005 n-NaOH bei 15°.

Zeit nach der Bereitung	10′	20′	30′	40′	60′	90′	120′
η	1,1058	1,1033	1,1033	1,1008	1,0969	1,0969	1,0969

Bei der Temperatur von 25° scheint bereits nach 10 Minuten der Hauptanteil der Viscositätsänderung abgelaufen. Der sich anschließende allmähliche Reibungsabfall führt nach etwa 2 Stunden zu längerer Konstanz.

0,5 % Casein + 0,005 n-NaOH bei 25°.

Zeit nach der Bereitung	10′	20′	30′	50′	60′	70′	90′	100′	300′
η	1,1097	1,1097	1,1080	1,0736	1,0671	1,0589	1,0557	1,054	1,054

Verwickelter werden, wie die nächsten Versuche zeigen, die Verhältnisse bei steigendem Alkaligehalt der Caseinate.

Tabelle II.

Kalilauge und 0,5 % Casein bei 25°. Stammlösung und Verdünnungsflüssigkeit vorgewärmt. Erste Messung 3 Minuten nach der Mischung, 1 %ige Stammlösung η = 1,2471.

Konzentration der KOH	0,0045 n	0,0055 n	0,0095 n	0,0145 n	0,0165 n	0,0185 n	0,0195 n
Sofort	1,126	1,1342	1,2112	1,1948	1,1882	1,1915	1,1817
Nach 5′	—	1,1326	1,2079	1,1915	1,1882	1,1915	1,1817
" 10′	—	1,1129	1,2079	1,1915	1,1866	1,1915	1,1817
" 15′	—	1,1047	1,1915	1,1833	1,1866	1,1915	1,1817
" 20′	—	1,0965	1,1457	1,1538	1,1866	1,1817	1,1817
" 30′	—	1,0818	1,1080	1,1260	1,1653	1,1669	—
" 40′	—	1,0753	—	1,0884	1,1211	1,1506	—
" 50′	—	1,0753	—	1,0753	1,0917	1,1392	—
" 60′	—	—	1,0802	1,0753	1,0818	1,1293	—
" 70′	—	—	—	—	—	1,1211	—
" 80′	—	—	—	—	—	1,1146	—
			nach 6h: 1,0802	nach 17h: 1,0753	nach 7h: 1,0802	nach 8h: 1,0835	nach 70h: 1,0655

Nach unseren Versuchen findet sich somit in sämtlichen frisch hergestellten Caseinatlösungen ein zeitlicher, bei höherer Temperatur gesteigerter Abfall der inneren Reibung, dessen Geschwindigkeit in bestimmter Weise mit dem Alkalizusatz erst steigt und dann fällt, so daß in niederen Alkalikonzentrationen die anfänglichen Reibungsänderungen groß, in höheren gering sind. Diese Beziehungen hängen mit dem eigentüm-

Tabelle III.

Natronlauge + 0,5 % Casein bei 25°.

1 %ige Stammlösung $\eta = 1{,}2427$.

Konzentration der NaOH	0,0045 n	0,0055 n	0,0095 n	0,0145 n	0,0185 n	0,0195 n
Sofort	1,1185	1,1849	1,2028	1,2064	1,1939	1,1885
Nach 5′	—	1,1723	1,2028	1,2064	1,1939	1,1885
„ 10′	1,1023	1,1454	1,1975	1,1993	1,1939	1,1885
„ 15′	—	—	1,1849	1,1939	1,1939	1,1885
„ 20′	—	1,1383	1,1777	1,1849	1,1939	1,1885
„ 30′	1,0933	1,1310	1,1759	1,1849	—	—
„ 40′	—	1,1221	1,1723	1,1795	—	—
„ 50′	—	1,1149	1,1634	1,1705	—	—
„ 60′	—	1,1149	1,1580	1,1508	—	—
„ 70′	—	—	1,1490	1,1490	—	—
		nach 17h: 1,1041	nach 5h: 1,1041	nach 8h: 1,1039	nach 45h: 1,1039	nach 30h: 1,0956

lichen Gange der Anfangswerte der Reibung bei verschiedenem Alkaligehalt zusammen.

Wir können nämlich die bisher nicht nachgeprüften Beobachtungen von Laqueur und Sackur bestätigen, daß die innere Reibung von Caseinatlösungen mit steigendem Laugen-

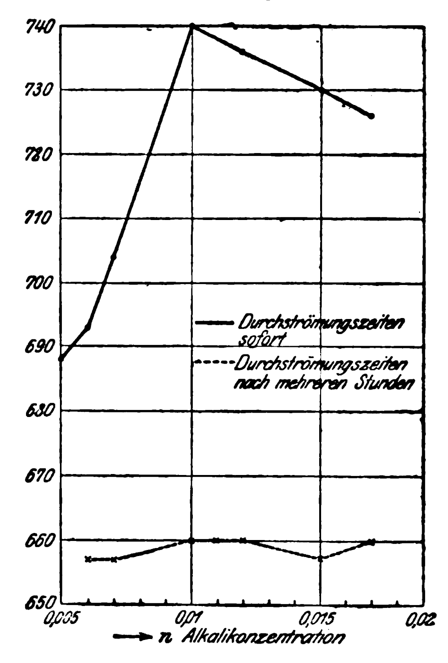


Fig. 1.

zusatze durch ein Maximum geht, um bei weiterer Alkalizugabe wieder abzufallen. Das Maximum lag in unseren Versuchen zwischen 0,0095 und 0,0145 n-Alkaligehalt. Diese Gesetzmäßigkeit gilt jedoch, wie unsere Versuchstabellen lehren, nur für die Anfangswerte der Viscosität. Indem nämlich der zeitliche Reibungsabfall von den höheren Ausgangswerten schneller erfolgt als von den niederen, ist nach ungefähr 1 Stunde der größte Teil der ursprünglichen Differenzen ausgeglichen (Fig. 1).

Bis zu einem gewissen Grade ist also unser Verständnis der zeitlichen Reibungsänderung mit demjenigen für das Zustandekommen des Reibungsoptimums bei variierendem Laugengehalt verknüpft.

Die Tatsache, daß die innere Reibung einer Caseinatlösung mit wachsendem Basenzusatz einen Höhepunkt überschreitet, bildete die Grundlage der zuerst von Laqueur und Sackur aufgestellten Theorie, nach der die freien Caseinionen die Träger der hohen Reibung[1]) sind. Im Überschusse von Alkalihydroxyd würde die Dissoziation des Caseinats eine Zurückdrängung erfahren, die mit der Verminderung der Caseinionen als Reibungsabfall zum Ausdrucke kommt. Diese Auffassung setzt voraus, daß das Casein als Säure typische Alkalisalze bildet, die in ein negatives Proteinion und ein positives Metallion dissoziieren. Laqueur und Sackur haben nur eine einzige Versuchsreihe mitgeteilt, die im Sinne eines Reibungsmaximums von Caseinat bei steigendem Alkalizusatz spricht. Zumal nach Kenntnis der zeitlichen Reibungsänderung wirkt die Dürftigkeit der experimentellen Grundlagen ihrer (später als richtig erwiesenen) Lehre höchst überraschend. Denn die zweite zur Stütze ihrer Anschauung angeführte Beobachtung — Erniedrigung der Reibung eines Natriumcaseinats durch Natriumchlorid —, die im Sinne einer Ionisationszurückdrängung des Caseinats gedeutet wird, entbehrt einer jeden Beweiskraft. Wie sich nämlich herausstellte, entfaltet hier ein beliebiges anderes Neutralsalz dieselbe reibungsherabsetzende Wirkung wie das gemeinionige Kochsalz. Entgegen Laqueur und Sackur vertritt Robertson die Ansicht,

---

[1]) Die Darstellung in L. Michaelis „Die Wasserstoffionenkonzentration", J. Springer 1914, daß diese Autoren die Rolle der Ionenhydratation erkannt haben, ist unrichtig (vgl. diesen Bd. S. 504).

daß die Bindung von Alkali oder Säure an Eiweißkörper unter Eintritt des Metalles oder Säureradikales in das Eiweißmolekül erfolgt, wobei dieses in zwei Bruchstücke, einen negativen und positiven „Proteinsplitter“, zerfällt.

Durch die direkte Messung der freien Wasserstoff- und Chlorionen und damit der Ionisation des Proteinchlorids und den Nachweis ihrer Zurückdrängung im Säureüberschuß (K. Manabe und J. Matula) ist die Lehre Robertsons für das Säureprotein widerlegt worden. Ferner wurde für dieses Beispiel durch den Zusammenfall des Ionisationsmaximums mit einem Reibungsoptimum die Ansicht, daß hier die hohe Reibung eine Eigenschaft der freien Eiweißionen ist, unmittelbar bewiesen. Wiewohl es nahe lag, auf Grund der analogen Reibungskurven von dem sichergestellten Fall des Säureproteins auf den des Alkalicaseins zurückzuschließen und die Erklärung von Laqueur und Sackur anzunehmen, die vor Robertsons Ansichten den Vorzug großer Einfachheit besitzt, erschien uns dennoch eine weitere experimentelle Prüfung der Verhältnisse unbedingt notwendig. Trotz einer gewissen allgemeinen Übereinstimmung bestehen nämlich tiefere Verschiedenheiten zwischen Alkali- und Säureprotein[1]), die zur Vorsicht mahnen. Hierher gehören beim Alkaliprotein die Neigung zu zeitlichen Veränderungen, die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion in der Enolform, das Auftreten von Racemisierung, das abweichende Verhalten gegen Neutralsalze der Erdalkalien u. a. Wir haben deshalb an die viscosimetrische Untersuchung zunächst Messungen der elektrischen Leitfähigkeit von Caseinatlösungen angeschlossen.

II. Elektrische Leitfähigkeit der Caseinate.

Sämtliche Bestimmungen der elektrischen Leitfähigkeit wurden im Thermostaten in Kohlrausch-Gefäßen mit nach dem Platinieren schwach geglühten Elektroden ausgeführt. Als Stammlösung diente 1 $^0/_0$ Casein in 0,01 n-Natronlauge, aus der die Verdünnung auf die Hälfte bereitet wurde. Die Stammlösung und ihre Verdünnung mit Wasser zeigte, in der beschriebenen Weise aufbewahrt, keine Änderung der Leitfähigkeit innerhalb von 5 Tagen.

[1]) Es handelt sich hier nur um die Einwirkung sehr geringer Konzentrationen von Lauge oder Säure bei niederer Temperatur.

Tabelle IV.

Zeitliche Änderungen von $K \cdot 10^5$.

Spezifische Leitfähigkeit $K \cdot 10^5$ von 1% Casein in 0,01 n-NaOH = 54,76.

Spezifische Leitfähigkeit $K \cdot 10^5$ von 0,5% Casein in 0,005 n-NaOH = 30,08.

Überall 0,5% Casein bei variierendem Alkaligehalt. Versuchstemperatur 25°.

NaOH-Gehalt der 0,5%igen Caseinlösung				
0,006 n	0,008 n	0,01 n	0,015 n	0,025 n
39,51	64,99	89,04	179,7	402,3
nach 20′: 39,51	nach 10′: 64,99	nach 20′: 89,04	nach 10′: 179,7	nach 10′: 402,3
nach 40′: 39,37	nach 25′: 63,33	nach 40′: 89,04	nach 20′: 179,7	nach 20′: 402,3
nach 50′: 39,37	nach 60′: 59,53	nach 5ʰ: 81,20	nach 35′: 179,7	nach 30′: 398,1
nach 60′: 39,37	nach 1ʰ 30′: 58,96	nach 40ʰ bei 16°, dann 6ʰ bei 25°: 74,36	nach 40′: 176,9	nach 60′: 390,1
	nach 48ʰ, davon 40ʰ bei 16°: 55,58		nach 60′: 176,9	nach 1ʰ 30′: 390,1
			nach 1ʰ 10′: 174,8	nach 1ʰ 45′: 388,0
			nach 1ʰ 30′: 169,9	nach 2ʰ: 384,2
			nach 2ʰ: 165,8	nach 18ʰ: 282,2
			nach 40ʰ: 114,5	nach 48ʰ: 207,7

Diese Beobachtungen lehren, daß innerhalb der ersten halben Stunde, in welche die ausgiebigste Änderung der Viscosität fällt, eine nennenswerte Änderung der elektrischen Leitfähigkeit von Caseinatlösungen bei 25° nicht stattfindet. Erst gegen Ende der ersten Stunde wird eine Abnahme der elektrischen Leitfähigkeit merklich, die in den folgenden Stunden und Tagen zunimmt und bei höherem Alkaligehalt innerhalb 48 Stunden nahezu 50% des Ausgangswertes erreichen kann.

Für diese Abnahme der elektrischen Leitfähigkeit würde eine zeitliche Zunahme der Laugenbindung an Casein unter Verschwinden von freien Hydroxylionen die nächstliegende Erklärung bieten. In der Tat konnte in höheren Laugenkonzentrationen mittels elektrometrischer Messungen[1]) ein zeitlicher Anstieg der Bindung an das Casein nachgewiesen werden. Allein

[1]) Die Versuche folgen in der nächsten Mitteilung.

diese Erklärung kann unmöglich für niederen Gehalt an Alkali zutreffen, bei dem von vornherein eine so gut wie vollständige Aufnahme desselben durch das Casein besteht. Es müssen also weitere Umstände für das fortschreitende Sinken der Leitfähigkeit von Caseinatmischungen in Betracht kommen, für die sich aus Berechungen der äquivalenten Leitfähigkeit einige Anhaltspunkte ergeben.

Da wir keine Möglichkeit einer direkten Bestimmung der Metallionenkonzentration in unseren Caseinatlösungen besitzen, so kann man probeweise die äquivalenten Leitfähigkeiten von Alkalicaseinaten unter der Annahme berechnen, daß ein mit Lauge bis zur eben erreichten neutralen Reaktion (gegen Phenolphthalein) in Lösung gebrachtes Casein ein typisches Alkalisalz vorstellt. Dann würde die dazu erforderliche Laugenkonzentration zugleich die Normalität des gebildeten Alkalicaseins vorstellen. Diese Annahme wurde von Laqueur und Sackur ohne jede Einschränkung als selbstverständlich eingeführt, während sie hier zunächst nur hypothetisch aufgestellt und ihre experimentellen Folgerungen geprüft werden sollen.

Wir haben in der beistehenden Tabelle die für unsere Konzentrationen gefundenen mit den von Laqueur und Sackur gleichfalls bei 25° ermittelten Leitfähigkeiten in eine Reihe gebracht, die ein überaus befriedigendes Zusammenstimmen der Werte anzeigt.

Tabelle V.

Natriumcaseinat. Äquivalente Leitfähigkeit $\lambda = \frac{K}{n} \cdot 1000$ bei 25°.

Unsere Resultate sind mit * bezeichnet.

Casein %	K	λ
2,84	$11{,}6 \cdot 10^{-4}$	46,5
1,42	$6{,}41 \cdot 10^{-4}$	51,3
*1,00	*$5{,}476 \cdot 10^{-4}$	*54,76
0,71	$3{,}51 \cdot 10^{-4}$	56,2
*0,5	*$3{,}009 \cdot 10^{-4}$	*60,18
0,355	$1{,}97 \cdot 10^{-4}$	63,00
0,1775	$1{,}09 \cdot 10^{-4}$	69,5

Man kann nun die Werte von λ in zweifacher Weise zur Prüfung der Hypothese einer Alkalisalzbildung beim Caseinat benutzen:

1. Durch Schätzung der Beweglichkeit des Caseinations und Vergleich derselben mit derjenigen anderer Proteinionen.

2. Durch Prüfung des Einflusses verschiedener Alkalimetalle auf die äquivalente Leitfähigkeit der zugehörigen Caseinate.

Ad 1. Bei genügend hoher Verdünnung sind die Alkalisalze verschiedener Säuren als gleich stark dissoziiert zu betrachten, so daß man die äquivalenten Leitfähigkeiten und die Anteile der Ionen an denselben direkt miteinander vergleichen kann. So würde sich für Natriumbromid und ein Natriumcaseinat bei 25° ergeben:

0,005 n-Natriumbromid (W. Ostwald)	0,005 n-Natriumcaseinat
$\lambda = 126$	$\lambda = 60{,}18$
$\lambda_{Na} = 49$	$\lambda_{Na} = 49{,}00$
$\lambda_{Br} = 76$	$\lambda_{Caseinat} = 11{,}18$

Fortgesetzte Verdünnung bringt in diesen Konzentrationen nur noch geringe Steigerungen der äquivalenten „Ionenleitfähigkeiten" hervor, so daß $\lambda_{Caseinat} = 12$ nicht allzu weit vom Endwerte entfernt sein dürfte. Man kann nun auf analoge Weise zu einer Schätzung der Caseinationenbeweglichkeit bei steigendem Laugenzusatze gelangen, wobei nur jene Basenkonzentrationen benutzt wurden, die fast vollständig an das Protein gebunden werden. Der aus elektrometrischen Bestimmungen[1]) bekannte freie Laugenanteil wurde rechnerisch berücksichtigt.

Tabelle VI.
Casein 0,5% (25°).

Normalität des zugesetzten NaOH	$\lambda_{korrigiert}$	λ_{Casein}
0,005 n	60,18	11,18
0,006 n	65,85	16,85
0,01 n	77,00	29,00

Nach diesen Versuchen würde mit steigendem Alkalizusatz die Beweglichkeit der Caseinionen zunehmen. Das gleiche Gesetz ist bei steigendem Säurezusatz zu Albumin und Glutin für die genau gemessene Beweglichkeit der positiven Proteinionen von Sven Odèn und Pauli[2]) nachgewiesen worden. Ferner fanden diese Untersucher die gleiche Größenordnung der Proteinionenbeweglichkeiten, die in ihren Versuchen zwischen 11,11 und 30,95 schwankten. Der Anstieg der Wanderungsgeschwindigkeiten mit zunehmender Säurebindung wurde von diesen Autoren mit einer Bildung mehrwertiger Proteinionen in Zusammenhang gebracht, die den

[1]) Siehe eine folgende Mitteilung.
[2]) Anzeiger der Kais. Akad. d. Wiss. 24, 20. XI. 1913.

Eintritt mehrerer Säuremoleküle in ein Eiweißmolekül begleitet. Denn die Zunahme der äquivalenten Ionenbeweglichkeit bei Anwachsen der Wertigkeit eines Komplexes ist eine überaus typische Erscheinung. Man darf also in den Beobachtungen über das Anwachsen der äquivalenten Leitfähigkeit der Caseinmischungen mit zunehmendem Laugengehalt eine Stütze für die Annahme eines Alkalicaseinats erblicken, in dem das Casein als mehrwertige Säure auftreten kann.

Ad 2. Auch die Erfahrungen an Caseinaten verschiedener Alkalien sprechen in diesem Sinne. Seit den klassischen Untersuchungen von Kohlrausch wissen wir, daß die äquivalenten Leitfähigkeiten verschiedener Alkalisalze derselben Säure in gleicher Verdünnung und bei derselben Temperatur um einen Betrag differieren, der gleich ist dem Unterschiede der Beweglichkeiten der betreffenden Metallionen. Wenn die Anschauung richtig ist, daß die Caseinate typische Alkalisalze bilden, dann war zu erwarten, daß ihre äquivalente Leitfähigkeit nach dem von Kohlrausch gefundenen Gesetz von der Beweglichkeit des betreffenden Metallions abhängig ist. Es müßten demnach Kalium- und Ammoniumcaseinate infolge der nahezu gleichen Beweglichkeit von $K^{\cdot}$ und $NH_4^{\cdot}$ übereinstimmende äquivalente Leitfähigkeiten besitzen, dagegen sollten die Caseinate des langsamer wandernden Natriumions entsprechend kleinere Werte ihrer äquivalenten Leitfähigkeiten aufweisen.

Die folgenden Versuchsreihen zeigen in der Tat, daß die Natriumcaseinate, ganz der Erwartung gemäß, um einen konstanten Wert niedrigere äquivalente Leitfähigkeiten besitzen als die Kaliumcaseinate (Tabelle VII), und daß unsere Bestimmungen der äquivalenten Leitfähigkeit der Kaliumcaseinate

Tabelle VII.

Sämtliche Lösungen aus einer 1%igen Caseinlösung in 0,01 n der betreffenden Lauge bereitet. Die spezifischen Leitfähigkeiten K sind Mittelwerte einer Messungsreihe. Versuchstemperatur 18°.

Verdünnung	Casein + NaOH		Casein + KOH		
	$K_1 \cdot 10^5$	λ_1	$K_2 \cdot 10^5$	λ_2	$\lambda_2 - \lambda_1$
0	52,83	52,83	66,96	66,96	14,13
1 : 1	28,71	57,42	35,83	71,66	14,24
1 : 2	20,71	62,13	25,61	76,8	14,7
1 : 3	15,77	63,08	19,49	77,96	14,88

mit solchen der Ammoniumcaseinate, die seinerzeit von Laqueur und Sackur gemessen worden waren, sehr gut übereinstimmen (λ_2 und λ_3 in Tabelle VIII).

Tabelle VIII.

Casein + KOH			Casein + NH_4OH (nach Laqueur und Sackur)		
Caseingehalt	$K_2 \cdot 10^5$	λ_2	Caseingehalt	$K_3 \cdot 10^5$	λ_3
1,00 %	66,96	66,96	1,02 %	59,0	65,6
0,50 %	35,83	71,66	0,51 %	32,1	71,4
0,25 %	19,49	77,96	0,26 %	17,3	77,2

Zeigen somit diese Versuche unzweideutig ein Ergebnis an ganz im Sinne einer Alkalisalzbildung bei der Neutralisation von Casein mit Laugen, so ist noch festzustellen, wie weit die Übereinstimmung eine quantitative ist. Vergleicht man in den Tabellen von Kohlrausch-Holborn die äquivalenten Leitfähigkeiten von gleichen Konzentrationen Kalium- und Natriumsalz, so beträgt die Differenz derselben konstant 20 bis 22, während wir bei 18°, derselben Versuchstemperatur, zwischen Kalium- und Natriumcaseinat nur 14 bis 15 finden. Dieser Unterschied läßt sich durch die Annahme erklären, daß nur rund 70 bis 80 % des Caseins zu typischem Alkalisalz wird, während der Rest andersartige, leitende Komplexe bildet. Diese auch aus anderen Gründen wahrscheinliche Vorstellung gestattet, an der plausiblen, für das Säureprotein zwingend nachgewiesenen Erklärung des Reibungsoptimums auch beim Alkalicasein festzuhalten. Dagegen würde Robertsons Lehre vom Eintritt des Metalls in große Eiweißkomplexe unter Verlust seines ionischen Charakters nicht nur die Wirkung des Laugenüberschusses auf die Reibung ohne ad-hoc-Annahmen unverständlich erscheinen lassen, sondern es bliebe auch dunkel, wie die Beweglichkeit der verschiedenen Metallionen in den großen Atomverbänden in jener gesetzmäßigen, für normale Metallsalze typischen Weise zur Geltung kommen könnte, die unsere Messungen dargetan haben.

III. Gefrierpunktsbestimmungen.

Von den einander entgegenstehenden Anschauungen bleibt noch ein wesentlicher Punkt einer Aufklärung bedürftig. Während von einer Reihe älterer Autoren und dem Verfasser der

Standpunkt vertreten wird, daß bei mäßiger Einwirkung und niederer Temperatur mit zunehmendem Säure- oder Laugengehalt entsprechend mehr Säure- oder Laugenmoleküle mit einem Eiweißmolekül in Reaktion treten, wobei das Protein unter Erhaltung der säureamidartigen Verknüpfung als mehrwertige Base oder Säure funktioniert, vertritt Robertson die Ansicht, daß jedes in Reaktion tretende Säure- oder Basenmolekül zugleich je eine Peptidverkettung sprengt. Für das Alkalicaseinat stützt sich diese Annahme auf Beobachtungen, nach denen die Gefrierpunktsdepression einer Lauge durch Caseinzusatz keine nennenswerte Änderung erfahren soll. Da müßten in der Tat im Sinne von Robertsons Lehre an Stelle von verschwindenden OH- und Alkaliionen ebensoviel neugebildete Caseinationen treten.

Wir haben die übrigens auffallend schwankenden Gefrierpunktsbestimmungen von Robertson und Burnett nicht bestätigen können, sondern auch bei Alkalicasein ein Verhalten gefunden, das den alten Untersuchungen von Bugarsky und Liebermann am Albumin vollständig entspricht. Diese Autoren hatten gezeigt, daß die Gefrierpunktsdepression von Lauge durch Eintragen von Albumin abnimmt. Diese Abnahme findet ihre Erklärung darin, daß für mehrere verschwindende OH-Ionen ein Proteinion auftritt, daß also das Protein als mehrwertige Säure reagiert. Die gleiche Erscheinung ist ausnahmslos in den folgenden Tabellen erkennbar, welche die von uns gleichfalls bestimmten Δ-Werte der reinen Lauge enthalten. Stets wird durch die Auflösung des Caseins der Gefrierpunkt der reinen Lauge erhöht, die Depression also verkleinert.

Tabelle IX.

Gefrierpunktsdepressionen.

n-NaOH	Δ ohne Casein	Δ' mit Casein	$\Delta - \Delta' \cdot 10^3$	n-NaOH	Δ ohne Casein	Δ' mit Casein	$\Delta - \Delta' \cdot 10^3$
0,005	0,018°	0,014°	4	0,055	0,198°	0,185°	13
0,015	0,053°	0,030°	23	0,065	0,238°	0,225°	13
0,025	0,090°	0,080°	10	0,085	0,308°	0,295°	13
0,035	0,128°	0,115°	13	0,125	0,458°	0,445°	13
0,045	0,164°	0,150°	14				

$\Delta - \Delta'$ nimmt mit steigender Laugenbildung bis zu einem Maximum zu, dann wegen der Ionisationszurückdrängung

durch den Laugenüberschuß bis zu einem konstanten Werte wieder ab.

Mit wachsendem Caseingehalt nimmt die Differenz der Δ-Werte gegenüber der reinen Lauge zu (Tabelle X).

Tabelle X.

Casein	n-NaOH	Δ reine Lauge	Δ' mit Casein	$\Delta - \Delta' \cdot 10^3$
2,0 %	0,02	0,072	0,040	32
1,0 %	0,01	0,036	0,027	9
0,5 %	0,005	0,018	0,014	4

Zu Schlüssen auf das Molekulargewicht des Caseins erscheint uns die Gefrierpunktsmethode nicht geeignet. Kleine Mengen von Abbauprodukten, Änderungen des Dispersitätsgrades durch Assoziation der Teilchen können starke, nicht übersehbare Einflüsse entfalten. Ein Beispiel dafür bietet der folgende Versuch über die Rolle einer geringen reversiblen Toluoltrübung.

Überall 1 % Casein in 0,01 n-NaOH.
Wasserwert $t = 4{,}590^0$.

	I. Ohne Toluol in der Kälte gehalten	II. Dieselbe Lösung 12h unter Toluol in der Kälte	III. Lösung II leicht erwärmt und geschüttelt
Ablesungen am Beckmann-Thermometer	4,550°	4,530°	4,550°

Zeitliche Änderungen der Gefrierpunktsdepression des Caseinats konnten innerhalb 24 Stunden bei einem Gehalte von 0,5 % Casein in 0,015 n-Natronlauge nicht gefunden werden. Dagegen fanden sich solche bei höherem Laugengehalte als stetige Abnahme der Gefrierpunktserniedrigung, eine zeitliche Verminderung der molekularen Konzentration anzeigend.

Tabelle XI.
Überall 0,5 % Casein.

Δ-Werte	Gehalt an NaOH		
	0,085 n	0,105 n	0,125 n
Sofort	0,295°	0,370°	0,445°
Nach 24h	0,288°	0,325°	0,360°
„ 48h	0,270°	0,295°	0,320°
„ 27h	0,225°	0,265°	—

Die durch diese Versuche angezeigte, spät und nur bei höherem Alkaligehalt auftretende Abnahme der molekularen

Konzentration kann sich nur an neutralen Caseinatteilen vollziehen. Sie entspricht offenbar einer Aggregatbildung derselben, wie sie analog der bekannten Säurefällung von Säureprotein auch am Laugenalbumin bis zur Flockung gehend von Pauli und R. Wagner beobachtet werden konnte.

In bezug auf die Frage der Laugenbindung durch Casein lehren unsere Versuche übereinstimmend, daß dieser Vorgang in der Hauptsache als Bildung eines typischen Alkalisalzes betrachtet werden kann. Die vermeintlichen Widersprüche gegen eine solche Auffassung lassen sich zum Teil als in den Tatsachen nicht begründet erweisen, zum Teil auf neben diesem Vorgange verlaufende Prozesse zurückführen. Mit wachsendem Alkaligehalt tritt das Casein als Säure höherer Wertigkeit auf. Weitere zwingende Beweisstücke für diese Auffassung ergeben sich aus unseren ausgedehnten elektrometrischen Bestimmungen und dem elektrolytischen Verhalten, die den Gegenstand einer folgenden Mitteilung bilden werden.

Besonderer Aufmerksamkeit wert scheinen uns die mit der Caseinatbildung verknüpften zeitlichen Vorgänge zu sein. Diese Vorgänge können nach den Gefrierpunktsbestimmungen nicht als Ausdruck eines hydrolytischen Zerfalles angesehen werden. Für dieselben bleibt nur die Annahme einer intramolekularen Umlagerung in Alkaliprotein übrig. Bei der Alkalieinwirkung kommt nach der Eiweißstruktur auf Grund der Beobachtungen von H. Leuchs[1]), A. Kossel und F. Weiß[2]) sowie H. D. Dakin[3]) als nächstliegend die Keto-Enoltautomerie in Betracht. Aus Gründen, die bei Mitteilung unserer weiteren Beobachtungen am Casein dargelegt werden sollen, ist gerade dieser Körper unter den Proteinen ein besonders günstiges Objekt für das Studium solcher zeitlichen Umwandlungen, die unzweifelhaft ein aussichtsreiches und auch biologisch wichtiges Gebiet der allgemeinen Eiweißchemie betreffen.

---

[1]) H. Leuchs und W. Manasse, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **40**, 3235, 1907. — H. Leuchs und F. B. La Forge, ebenda **41**, 2586, 1908.

[2]) A. Kossel und F. Weiß, Zeitschr. f. physiol. Chem. **59**, 492, 1909; **60**, 311, 1909; **68**, 165, 1910.

[3]) H. D. Dakin, Amer. Chem. Journ. **44**, 48, 1910; Journ. of Biolog. Chem. **13**, 357, 1912.

Die Hydratation der Eiweißionen.

Von

Wo. Pauli.

(Eingegangen am 29. Juni 1915.)

Leonor Michaelis schildert in seiner Schrift: „Die Wasserstoffionenkonzentration“[1]) den Ursprung der Lehre von der Hydratation der Eiweißionen folgendermaßen:

„Schon von E. Laqueur und O. Sackur wurde die hohe innere Reibung von Caseinlösung auf die starke Hydratation der Caseinionen zurückgeführt, und auch Hardy deutete die hohe innere Reibung von Lösungen des Globulins in Säuren und Alkalien in gleichem Sinne.“

Diese Darstellung entspricht in keiner Richtung den Tatsachen und es ist unverständlich, wie eine solche bei einem gewissenhaften Autor möglich ist. Denn weder bei Laqueur und Sackur noch bei Hardy findet sich das Wort oder auch nur eine Andeutung von der Rolle der Hydratation. Die Lehre von der Hydratation der Eiweißionen ist zuerst von Pauli aufgestellt und von diesem und seinen Schülern experimentell auf breiter Grundlage geprüft worden.

Auch die übrigen in diesem Abschnitte seines Buches entwickelten Ansichten lassen wichtige Tatsachen[2]) unberücksichtigt und geraten mit längst feststehenden Erfahrungen in Widerspruch, worauf bei anderer Gelegenheit zurückgekommen werden soll.

Laboratorium für physikalisch-chemische Biologie der k. k. Universität Wien.

[1]) Verlag von J. Springer 1914.

[2]) Manabe und Matula, diese Zeitschr. 52, 369, 1913. Pauli, Kolloidzeitschr. 12, 222, 1913.

Berichtigung.

In der Arbeit „Winterstein, Neue Untersuchungen über die physikalisch-chemische Regulierung der Atmung“ in Heft 1 u. 2 dieses Bandes steht Figur 6 auf Seite 65 auf dem Kopf.

Autorenverzeichnis.

Adler, Ludwig. Über die Phosphatasen im Malz. S. 1.

Andersen, A. C. Zur Kenntnis der Eiweißkörper. I. Läßt sich durch Pepsin, Trypsin und Erepsin eine vollständige Hydrolyse der Eiweißkörper erreichen? S. 344.

— und Regitze Roed-Müller. Zur Kenntnis der Eiweißkörper. II. Über die Bindung des Ammoniaks in den Eiweißkörpern. S. 442.

Biberfeld, Johannes. Über die Mengenverhältnisse der Hirnlipoide morphingewöhnter Hunde. S. 158.

Bokorny, Th. Beitrag zur Kenntnis der chemischen Natur einiger Enzyme. S. 213.

Breuer, E., siehe Karczag.

Ducháček, F. Über den Yoghurtbacillus. S. 269.

Fernau, A., und W. Pauli. Über die Einwirkung der durchdringenden Radiumstrahlung auf anorganische und Biokolloide. S. 426.

Fischer, Albert. Hemmung der Indolbildung bei Bact. coli in Kulturen mit Zuckerzusatz. S. 105.

Glagolew, P. 2,5-Diketopiperazine und Formoltitrierung. S. 119.

Hägglund, Erik. Über den Einfluß des elektrischen Wechselstromes auf die Gärung der lebenden Hefe. S. 164.

— Zur Kenntnis der Kohlenhydrate des Fichtenholzes. S. 416.

Herzfeld, E. Über die proteolytische Wirkung der Eiweißabbauprodukte. Proteolyse mit Trypsindialysaten, Wirkung von gallensauren Alkalien, Bedingungen der Eiweißlöslichkeit. S. 262.

Hirsch, Ernst. Neue Ergebnisse über das Verhalten des Blutzuckers nach Aderlässen. S. 191.

Hirschfeld, L., und R. Klinger. Zur Frage der Cobragiftinaktivierung des Serums. S. 398.

Joachimoglu, Georg. Über den Nachweis des Benzols in Organen und seine Verteilung im Organismus. S. 93.

— Vergleichende Untersuchungen über die Giftigkeit der arsenigen Säure und Arsensäure. S. 144.

Karczag, L., und L. Móczár. Über die Vergärung der Brenztraubensäure durch Bakterien. II. S. 317.

— und Else Breuer. Über die Vergärung der Brenztraubensäure durch Bakterien. III. S. 320.

— und E. Schiff. Über die Vergärung der Brenztraubensäure durch Bakterien. IV. S. 325.

Klinger, R., siehe Hirschfeld.

Margosches, B. M. Betrachtungen über das Verhalten von C-, H-, O-haltigen organischen Verbindungen gegen Fehlingsche Lösung. S. 252.

Masslow, M. Untersuchungen über die Diazoreaktion des Hundeharnes und ihre Beziehungen zu Stoffwechselvorgängen. S. 306.

Móczár, L., siehe Karczag.

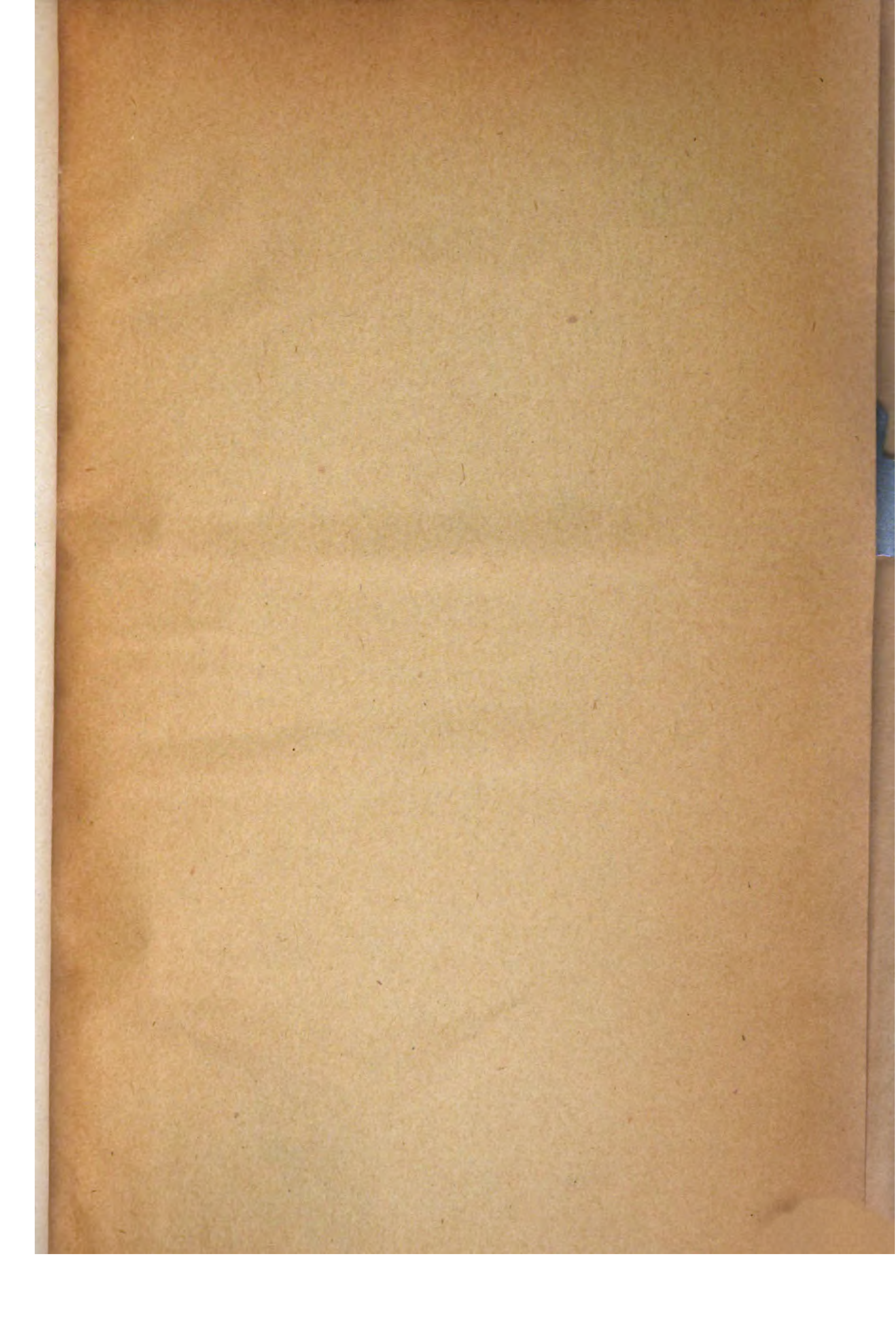
Moraczewski, W. von. Über den Indolgehalt der Verdauungsprodukte von Fibrin und Casein. S. 37.

Oryng, Thaddäus, und Wolfgang Pauli. Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide. XIX. Über Neutralsalzeiweißverbindungen. S. 368.

Palitzsch, Sven. Über die Anwendung von Borax- und Borsäurelösungen bei der colorimetrischen Messung der Wasserstoffionenkonzentration des Meerwassers. S. 333.

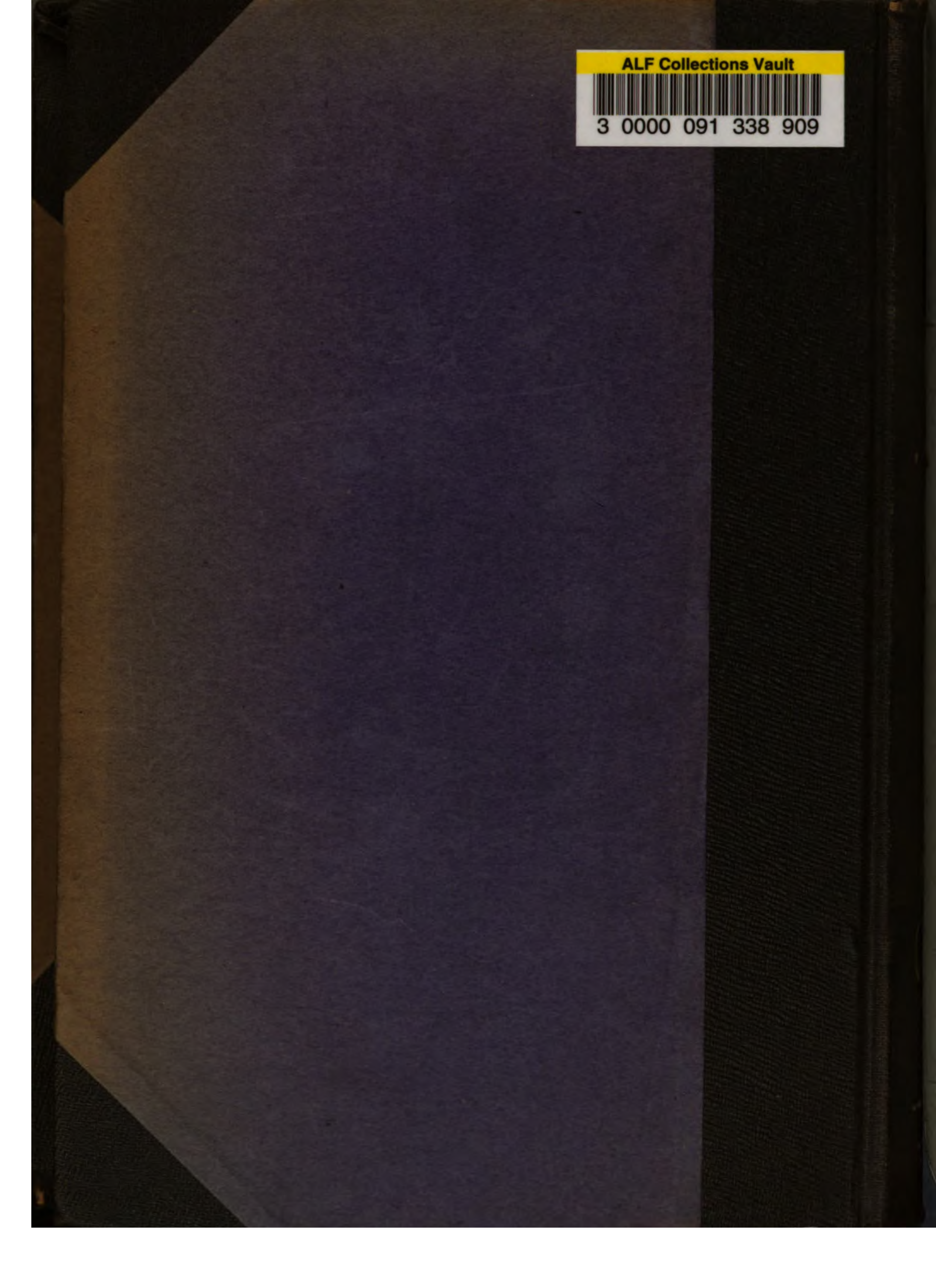
Pauli, Wolfgang. Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide XX. Zur allgemeinen Chemie der Caseinate. I. S. 489.
— Die Hydratation der Eiweißionen. S. 504.
Pauli, W., siehe Oryng.
— siehe Fernau.
Polimanti, Osw. Untersuchungen über den Koeffizienten des osmotischen Druckes von Bombyx mori L. während des ganzen Zeitraumes seiner Entwicklung. S. 74.
Richardson, Henry B. Der Einfluß von Eiweiß und Eiweißabbauprodukten auf die Glykogenbildung in der überlebenden Schildkrötenleber, ein weiterer Beitrag zur Frage der Funktion der Leber bei Verarbeitung von Eiweiß und Eiweißabbauprodukten. S. 171.
Roed-Müller, R., siehe Andersen.
Schiff, E., siehe Karczag.
Schulz, Hugo. Über den Kieselsäuregehalt der menschlichen Bauchspeicheldrüse mit Bemerkungen über die Gewichtsverhältnisse der Drüse in den verschiedenen Lebensaltern. S. 464.
Schneyer, J. Eine Methode zur quantitativen Milchsäurebestimmung im Harne. S. 294.
Siegfried, M., und R. Zimmermann. Über die Methode zur getrennten Bestimmung von Phenol und Parakresol im Harn. S. 124.
Stutzer, A. Untersuchungen über die Wirkung gewisser Arten von Milchsäurebakterien auf Eiweiß und auf andere Stickstoffverbindungen. S. 299.
Winterstein, Hans. Neue Untersuchungen über die physikalisch-chemische Regulierung der Atmung. S. 45.
Winterstein, Hans. Beiträge zur Kenntnis der Narkose. III. S. 130.
— Berichtigung. S. 504.

6









ALF Collections Vault
3 0000 091 338 909